

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Toxicologia

Efeitos da exposição à fumaça do cigarro e suas implicações
na neuroinflamação

Ana Carolina Cardoso Dos Santos Durão

Tese para obtenção do Título de Doutor

Orientadora: Prof^a. Dr^a Tania Marcourakis

Co-orientador (a): Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Toxicologia

Efeitos da exposição à fumaça do cigarro e suas implicações
na neuroinflamação

Ana Carolina Cardoso Dos Santos Durão

Versão Original

Tese para obtenção do Título de Doutor

Orientadora: Prof^a. Dr^a Tania Marcourakis

Co-orientador (a): Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

D948e	Durão, Ana Carolina Cardoso dos Santos Efeitos da exposição à fumaça do cigarro e suas implicações na neuroinflamação / Ana Carolina Cardoso dos Santos Durão. - São Paulo, 2019. 150 p.
	Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: Marcourakis, Tania Coorientador: Peron, Jean Pierre Schatzmann
	1. Neuroinflamação. 2. Fumaça do Cigarro. 3. Cultura primária de Glia. 4. EAE. I. T. II. Marcourakis, Tania, orientador. III. Peron, Jean Pierre Schatzmann, coorientador.

Ana Carolina Cardoso dos Santos Durão

Efeitos da exposição à fumaça do cigarro e suas implicações na
neuroinflamação

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do título de Doutor

Profa. Dra. Tania Marcourakis
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo____, _____ de 2019.

Dedico este trabalho ao meu avô José Cardoso dos Santos, por todo o ensinamento que nos passou em sua vida aqui na terra, por todo amor que dedicou, por todos os momentos de risadas que até hoje o senhor nos faz ter. Sinto muito a sua falta!

À minha mãe por mostrar que mesmo que a vida nos derrube sempre teremos força para levantar, que "Ohana" quer dizer família e família quer dizer nunca abandonar.

Ao meu irmão, por fazer parte da minha base e sempre me apoiar, pelos conselhos, conversas e pelos momentos tristes e alegres na qual sempre pude contar com você.

Ao meu companheiro de jornada, meu amigo, confidente, namorado e marido Wesley, obrigada por me mostrar a luz nos momentos de escuridão, por segurar a minha mão e me mostrar que dois sempre será mais forte que um. Sem você essa jornada seria praticamente impossível.

Á Tania,

A caminhada para o aprendizado nunca é fácil, mas você me mostrou que podemos percorrer o caminho mesmo com dificuldade. Obrigada por ser meu modelo de profissional, contribuindo a cada dia para o meu crescimento, e principalmente pela confiança depositada ao longo destes 10 anos. Ser sua aluna fez todo esse tempo valer a pena.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai pelo apoio nessa jornada.

A Julia e ao príncipe José, vocês fazem o meu dia mais feliz.

A minha avó Lucia, obrigado pelo carinho e momentos de risada!

Aos meus sogros e cunhada, pelo apoio durante essa jornada.

A família Nogueira Brandão pelo carinho do acolhimento, vocês fazem eu me sentir em casa.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron, por todo o conhecimento difundido, por todas as ideias trocadas, pelo carinho e pela amizade, mas principalmente pelo exemplo a ser seguido.

Aos doutores Raphael Caio Tamborelli Garcia e Larissa Helena Lobo Torres, por serem meus mentores, meus amigos e muitas vezes meus confidentes! Vocês com certeza fizeram a diferença.

Aos meus amigos Lídia e Vítor vocês foram fundamentais para manter a minha lucidez durante os períodos de tormenta.

Aos meus amigos do bloco 13B Stephanie, Sayuri, Mariana, Tatiana, Yuli, Gustavo, Marina, Cristina, Silvana, Gabriela, Ana Luisa, Jefferson, André, Cíntia, Lorena, Anax, Tiago, Sara e todos aqueles que já saíram

deste bloco, por serem companheiros nesta luta, por dividir as risadas e os problemas vou sentir falta de vocês.

Aos amigos do Laboratório de Interações Neuroimunes Carolina, Carla, Nágela, Lílian, Marília e Cristiano. Forma muitos os momentos que passamos juntos seja em experimentos, churrascos ou viagens e vocês sempre me acolheram como uma de vocês, obrigada.

À Profa. Dra. Carolina Munhoz e ao Dr. Nilton Barreto pelas trocas de conhecimento e ajuda em protocolos experimentais.

Ao Prof. Dr. Maurício Yonamine, e a Beatriz Bismara pela ajuda nos ensaios de cotinina.

À Profa. Dra. Alexandrina Sartori e aluna Luiza Ayumi Nishiyama Mimura do laboratório de vacinas e imunomodulação - IBB, UNESP, Botucatu pelo auxílio com as técnicas de histologia.

À Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro e ao Dr. Antônio Anax pela ajuda nos ensaios de metilação global.

À Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva e aluna Tanyara Baliani Payolla do laboratório biologia molecular do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP) pelo auxílio com as técnicas de miRNA.

Ao Ângelo, pelo cuidado e carinho durante toda esta jornada.

As novas amigas Nancy, Samantha e Elaine por todas as conversas, ajuda e apoio nos momentos mais difíceis.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

*"Talvez não tenha conseguido
fazer o melhor, mas lutei para que o
melhor fosse feito. Não sou o que
deveria ser, mas Graças a Deus, não
sou o que era antes".*

(Marthin Luther King)

RESUMO

Durão, ACCS. **Efeitos da exposição à fumaça do cigarro e suas implicações na neuroinflamação**. 2019. 141f. Tese (Doutorado em Farmácia: Fisiopatologia e Toxicologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O Sistema Nervoso Central (SNC) humano é formado por cerca de 86,1 bilhões de neurônios entre o encéfalo e a medula espinhal. O desenvolvimento pré-natal humano (tempo da concepção ao nascimento) possui cerca de 38 semanas, e é dividido na fase embrionária que corresponde ao período das 8 semanas iniciais da gestação, seguido pela fase fetal. A fase embrionária é o período mais vulnerável à ocorrência de anormalidades congênitas. Por ser um órgão com grande período de desenvolvimento, o SNC está sujeito às alterações genéticas, epigenéticas e ambientais. Durante a fase de implantação do embrião, o DNA é mais vulnerável às influências externas, como à fumaça do cigarro, aumentando o risco de retardo do desenvolvimento fetal, o risco de morte súbita pós-natal e de anormalidades do sistema imune. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da exposição à fumaça do cigarro sobre o processo de neuroinflamação da prole de camundongos C57BL/6 expostos à fumaça do cigarro durante a gestação e desafiados ou não com LPS. Para tanto, camundongos C57BL/6 fêmeas prenhes foram expostas à fumaça do cigarro desde o *plug* vaginal até o nascimento da prole. No 3º dia de vida, os filhotes foram separados para três linhas de trabalho: 1) “in vivo”: os animais foram desafiados com LPS pelo período de 4h, seguidos de eutanásia e análises de PCR Array do SNC. 2) “in vitro”: os encéfalos dissecados foram utilizados para a preparação de cultura mista de glia e da cultura enriquecida com neurônio. Após a maturação celular, as células foram estimuladas com LPS 100 ng/mL e, após 24h, foram realizados ensaios de CBA, citometria de fluxo, PCR, dosagem de NO, avaliação de morte celular e metilação global. 3) Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE): após o desmame, os animais foram mantidos em suas caixas moradia por 8 semanas sem nenhum estímulo externo, e então foram imunizados com MOG35-55 para o desenvolvimento da EAE. Nos experimentos “in vivo” observamos o aumento da transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório, como

interleucinas e quimiocinas. Em relação aos experimentos “in vitro” observamos maior crescimento de células astrocitárias (astroglíose), e células da microglia com aumento de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) bem como da transcrição e concentração de citocinas pró-inflamatórias e produção de NO. Em cultura enriquecida de neurônio, foi observado aumento na porcentagem de células em apoptose no grupo exposto à fumaça do cigarro desafiados ou não com LPS. O bloqueio da atividade da microglia pela minociclina reverteu a apoptose e diminuiu a produção de NO minimizando a morte celular. Em relação aos experimentos de EAE, os animais expostos à fumaça do cigarro no período gestacional, quando imunizados na vida adulta apresentam aumento no grau da doença bem como maior persistência da mesma quando observado escore clínico, além de acompanhados de um grau maior de infiltrado celular e desmielinização. Desta forma podemos concluir que a exposição à fumaça do cigarro durante o período gestacional leva a uma programação fetal com aumento da resposta neuroinflamatória frente a um estímulo sistêmico, trazendo consequências na vida adulta.

Palavras-chave: Neuroinflamação, Fumaça do cigarro, Cultura primária de Glia, Cultura enriquecida com neurônio, Encefalomielite Autoimune Experimental

ABSTRACT

Durão, ACCS. **Effects of exposure to cigarette smoke and its implications on neuroinflammation**. 2019. 141f. Thesis (Doctorate in Pharmacy: Pathophysiology and Toxicology) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

The human central nervous system (CNS) is made up of about 86.1 billion neurons between the brain and the spinal cord. The human prenatal development (time from conception to birth) is about 38 weeks, and is divided into the embryonic phase that corresponds to the period of the initial 8 weeks of gestation, followed by the fetal phase. The embryonic stage is the period most vulnerable to the occurrence of congenital abnormalities. Because it is an organ with a long period of development, the CNS is subject to genetic, epigenetic and environmental changes. During the embryo implantation phase, DNA is more vulnerable to external influences such as cigarette smoke, increasing the risk of delay on fetal development, risk of sudden postnatal death, and abnormalities of the immune system. In this context, the aim of this work is to evaluate the effects of exposure to cigarette smoke on the neuroinflammation process of offspring of C57BL/6 mice exposed to cigarette smoke during gestation and challenged or not with LPS. For this, pregnant female C57BL/6 mice were exposed to cigarette smoke from vaginal plug to offspring birth. On the 3rd day of life the offspring were separated into three lines of work: 1) *in vivo*: the animals were challenged with 1mg/Kg LPS and after 4h they followed to euthanasia; PCR analysis of the CNS was made in this period. 2) *in vitro*: dissected encephalon's were used for the preparation of mixed culture of glia and the culture enriched with neuron. After cell maturation, the cells were stimulated with 100 ng/mL LPS and, after 24 hours, CBA, flow cytometry, PCR, NO assay, cell death and global methylation assays were performed. 3) Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE): After weaning, the animals were kept in their housing for 8 weeks without any external stimulus, and then were immunized with MOG₃₅₋₅₅ for the development of EAE. In the *in vivo* experiments we observed increased transcription of genes related to the inflammatory process, such as interleukins and chemokines. *In vitro* experiments showed higher growth of astrocytes (astrogliosis) and microglia cells with increased stimulatory molecules

(CD80 and CD86) as well as the transcription and concentration of proinflammatory cytokines and NO production. In the enriched neuron culture, an increase in the percentage of cells in apoptosis was observed in the group exposed to cigarette smoke challenged or not with LPS. Blocking microglial activity by minocycline reversed apoptosis and decreased NO production by minimizing cell death. The EAE experiments shows that the animals exposed to cigarette smoke in the gestational period, when immunized in adulthood, present an increase in the degree of the disease as well as a greater persistence of the disease; The higher as the clinical score higher is the degree of cellular infiltration and demyelination. In this way we can conclude that the exposure to cigarette smoke during the gestational period leads to a fetal programming with increased neuroinflammatory response to a systemic stimulus and that this is able to last until the adult stage.

Keywords: Neuroinflammation, Cigarette smoke, Glia primary culture, Neuron enriched culture, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fechamento do tubo neural no humano em desenvolvimento.	26
Figura 2: Decurso temporal de alguns processos do desenvolvimento do SNC em roedores.	28
Figura 3: Proliferação/Migração de neurônios, micróglia e astrócitos.	29
Figura 4: Ramificação da microglia do desenvolvimento até a vida adulta.	30
Figura 5: Esquema ilustrativo de alterações inflamatórias na barreira hematoencefálica.	32
Figura 6: Vias de sinalização da polarização de macrófago.	34
Figura 7: Top 10 - países com maior consumo de cigarro em 2014.	38
Figura 8: Prevalência da exposição à fumaça do cigarro.	40
Figura 9: Desenho experimental do projeto.	50
Figura 10: Esquema demonstrativo do sistema venturi.	51
Figura 11: Avaliação dos parâmetros biológicos das fêmeas prenhes e dos neonatos.	68
Figura 12: Foto de campo claro da cultura mista de glia.	69
Figura 13: Imunofluorescência da cultura mista de glia.	70
Figura 14: Foto campo claro da cultura enriquecida com neurônio.	71
Figura 15: Imunofluorescência da cultura enriquecida de neurônio.	71
Figura 16: Dosagem das citocinas em homogenato total de SNC.	
Figura 17: Dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura mista de glia. ..	74
Figura 18: Gráfico representativo de PCR Array.	76
Figura 19: Citometria de Fluxo em cultura mista de glia.	78
Figura 20: PCR de cultura mista de glia.	79
Figura 21: Dosagem das citocinas em cultura mista de glia.	81
Figura 22: Dosagem de NO em cultura mista de glia.	82
Figura 23: Avaliação de Metilação Global.	83
Figura 24: Avaliação de miRNA.	84
Figura 25: Gate representativo de Anexina e PI.	85
Figura 26: Dosagem de Anexina e PI em cultura enriquecida de neurônio.	86
Figura 27: Dosagem de NO em cultura enriquecida de neurônio.	86
Figura 28: Dosagem das citocinas em cultura enriquecida com neurônio.	87
Figura 29: Avaliação do grau de EAE.	89

Figura 30: Marcação de Histologia dos animais com 40 dias de EAE.....	90
Figura 31: Marcação de Histologia dos animais no pico de EAE.....	91
Figura 32: Grau de Infiltrado celular.....	91

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Constituintes do cigarro padronizado 3R4F da Universidade de Kentucky.....	51
Tabela 2: Transição iônica de cotinina, 3-hidroxicotinina e cotinina D3.....	55
Tabela 3: Gradiente de concentração da fase B.....	55
Tabela 4: Parâmetros biológicos e de exposição.....	68

LISTA ABREVIÇÃO

3HC – 3-hidroxicotinina	IL – Interleucina
APC – Célula Apresentadora de Antígeno	iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzida
BHE – Barreira Hematoencefálica	LPS – Lipopolissacarídeo
CBA – <i>Cytometric Beads Array</i>	MHC – Complexo Maior de Histocompatibilidade
CCR – <i>Cystein Cystein Receptor</i>	miRNA – Micro RNA
CCL – <i>Cystein Cystein Ligant</i>	MOG – Mielina de Oligodendrócito
CFA – Adjuvante completo de Freud	NF-κB – Factor Nuclear Kappa B
CO – Monóxido de Carbono	NO – Óxido Nítrico
COHb – Carboxihemoglobina	OMS – Organização Mundial da Saúde
COT – Cotinina	PAMPs – Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
COTd3 – Cotinina deuterada	PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
DAMPs – Padrão Molecular Associado ao Dano	PTA – Poluição Tabagística Ambiental
DNA – Ácido Desoxirribonucleico	RNA – Ácido Ribonucléico
DNMT – DNA Metiltransferase	ROS – Espécies Reativas do Oxigênio
EAE – Encéfalomielite Autoimune Experimental	SNC – Sistema Nervoso Central
GFAP – Proteína Fibrilar Ácida da Glia	TLR – <i>Toll like receptor</i>
INF - Interferon	TNF – Fator de necrose tumoral

Sumário

1. INTRODUÇÃO	25
1.1.Sistema Nervoso Central.....	25
1.1.1. Formação do Sistema Nervoso Central	25
1.1.2. Surgimento das células da glia	28
1.2.Neuroinflamação	31
1.2.1 Alterações inflamatórias da Barreira Hematoenceálica.....	31
1.2.2. Alterações inflamatórias nas células da glia	33
1.2.3. Neuroinflamação e o surgimento de doenças	36
1.3.TABAGISMO	37
1.3.1. Epidemiologia	37
1.3.2. Fumo Passivo	39
1.3.3. Fumaça do Cigarro	41
1.3.4. Exposição à fumaça do cigarro e o surgimento de doenças inflamatórias.....	43
2. OBJETIVOS	47
2.1.Estratégias experimentais	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1.Desenho experimental e protocolo de exposição	49
3.2.Protocolo do período de eutanásia.....	51
3.3.Marcadores biológicos.....	52
3.3.1. Avaliação do consumo de água, ração e peso dos animais ..	52
3.3.2. Determinação da concentração de carboxihemoglobina (COHb).....	52
3.3.3. Determinação da concentração de cotinina e 3H-cotinina.....	54
3.4.Cultura Primária.....	56
3.5.Tratamento celular.....	56
3.6.Citometria de Fluxo	57
3.7.Avaliação de morte celular por Anexina e PI.....	58

3.8. Imunofluorescência	58
3.9. Dosagem de citocinas	59
3.10. Dosagem de óxido nítrico.....	59
3.11. PCR.....	59
3.12. Quantificação de miRNA	61
3.13. Metilação global (5mC)	62
3.13.1. Extração de DNA tecidual.....	62
3.13.2. Extração de DNA das células	62
3.13.3. Hidrólise e Quantificação do DNA.....	63
3.14. Encefalomielite autoimune experimental (EAE)	63
3.15. Histologia	64
3.16. Análise Estatística	64
4. RESULTADOS	67
4.1. Padronizações.....	67
4.1.1. Parâmetros Biológicos e de exposição	67
4.1.2. Cultura mista de glia	69
4.1.3. Cultura enriquecida neurônio	70
4.1.4. Cinética de Produção de Citocinas	72
4.1.5. Padronização da concentração de lipopolissacarídeo a ser utilizada na cultura	74
4.2. Resposta Neuroinflamatória “in vivo”.....	75
4.2.1. Perfil transcricional do SNC de Neonatos.....	75
4.3. Alteração da resposta inflamatória em cultura de células da microglia e astrócitos	77
4.3.1. Ativação celular por citometria de fluxo	77
4.3.2. Perfil transcricional da cultura de glia	79
4.3.3. Dosagem de citocinas.....	80
4.3.4. Dosagem de Oxido Nítrico (NO)	82
4.4. Mecanismos epigenéticos	83
4.4.1. Metilação Global	83
4.4.2. Dosagem de miRNA	83
4.5. Avaliação da interação de neurônios e células gliais em cultura.....	84

4.5.1. Avaliação de morte	84
4.5.2. Dosagem de Oxido Nítrico (NO)	86
4.5.3. Dosagem de citocinas.....	87
4.6.Avaliação das alterações causadas pela exposição da fumaça do cigarro <i>in útero</i> e suas repercussões na vida adulta	88
4.6.1. Encefalomielite autoimune experimental (EAE)	88
5. DISCUSSÃO	93
6. CONCLUSÕES	109
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	111
8. ANEXOS	124
8.1.Ficha do Aluno.....	124
8.2.Lattes.....	125
8.3.Comitê de Ética	126
8.4.Peso Fêmeas	128
8.5.PCR.....	129

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema Nervoso Central

1.1.1. Formação do Sistema Nervoso Central

O Sistema Nervoso Central (SNC) humano é possivelmente o órgão mais complexo, compreendendo cerca de 86,1 bilhões de neurônios entre o encéfalo e a medula espinhal. Um SNC adulto é capaz de ter entre centenas de trilhões à um quadrilhão de sinapses e utiliza cerca de 18% de todo o oxigênio corporal. Seu desenvolvimento se inicia na 4ª semana pós a concepção e ocorre até o terceiro ano pós-natal, sendo que após este período a taxa de crescimento diminui e processos como maturação, poda sináptica, e mielinização predominam (SILBEREIS et al., 2015).

O desenvolvimento pré-natal humano (tempo da concepção ao nascimento) possui cerca de 38 semanas, e é dividido na fase embrionária (56 dias ou 8 semanas) e na fase fetal (31 semanas), sendo que a fase embrionária é o período mais vulnerável às anormalidades congênitas. Por ser um órgão com grande período de desenvolvimento o SNC está sujeito a alterações genéticas, epigenéticas, e ambientais que podem acarretar em alterações morfológicas e funcionais (O'RAHILLY; MLLER, 2006; YAMADA et al., 2010).

O processo de neurulação se dá de maneira bem rápida em todos os mamíferos e tem seu início, aproximadamente no 23º dia pós-concepcional, com a indução da placa neural após a formação da notocorda. Este processo é seguido pelo desenvolvimento do sulco neural, o qual é composto pelas dobras neurais ao longo de cada lado da linha média da placa. O próximo passo na formação do SNC é a fusão das dobras neurais que se iniciam a partir do centro e seguem de maneira rostral e caudal para a formação do tubo neural como apresentado na Figura 1 (SILBEREIS et al., 2015).

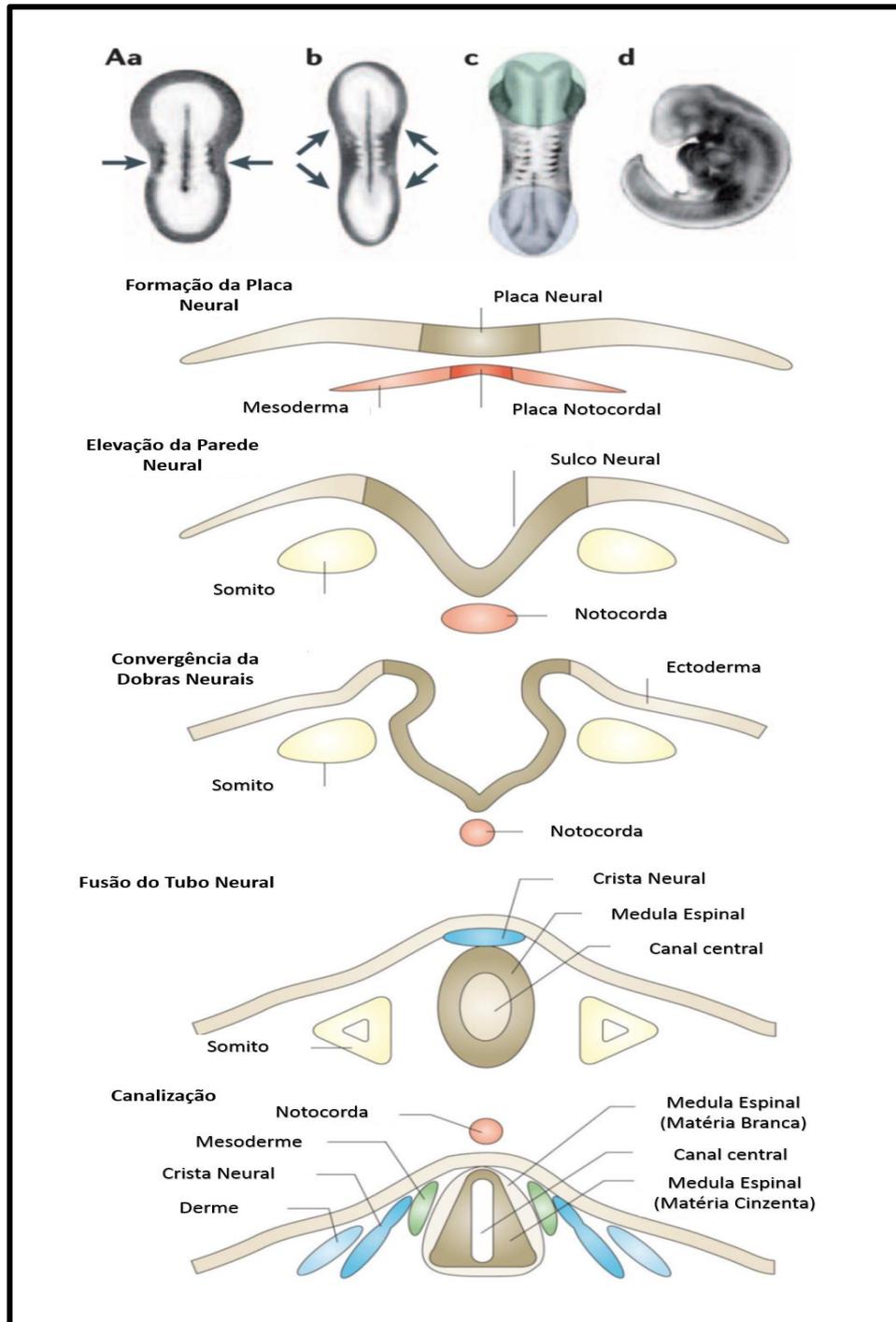


Figura 1: Fechamento do tubo neural no humano em desenvolvimento A) Quatro fases da neurulação primária no fechamento do tubo neural. Os painéis (a – c) são vistas dorsais, enquanto o painel (d) é uma vista lateral. (a – c) Fusão bidirecional iniciada a partir do local de iniciação original na região cervical média (a), seguida de fusão bidirecional continuada (b e c) rostralmente em direção ao neuroporo anterior (sombreamento azul) e caudalmente em direção ao neuroporo posterior (sombreamento verde), que progride como resultado de extensão convergente e constrição apical. O painel (d) mostra um tubo neural fechado, com fusão completa sobre o rombocéfalo, que ainda tem que ser coberto externamente. B) Estágios do fechamento do tubo neural em uma seção transversal. A placa neural eleva-se para formar dobras neurais, que progressivamente se apoiam, finalmente se fundindo para criar um tubo neural fechado. Isso ocorre pouco antes do final do primeiro mês de gravidez. Adaptado de BLOM et al. (2006).

Por possuir um crescimento desigual, nesta fase, o SNC é dividido em seu neuroeixo nas três principais vesículas do cérebro: o prosencéfalo (cérebro anterior), o mesencéfalo (cérebro médio) e o romboencéfalo (cérebro posterior), restando a parte caudal para a formação da medula espinhal. Estas regiões são subdivididas e crescem rapidamente a medida que o desenvolvimento pré-natal avança (O'RAHILLY; MLLER, 2006).

O período fetal é caracterizado principalmente pelo crescimento, diferenciação e formação dos órgãos (organogênese), ocorrendo um aumento de 40 vezes no peso encefálico. Após o nascimento o desenvolvimento do SNC é caracterizado por um crescimento de dendritos e axônios, seguido pela sinaptogênese, proliferação glial e mielinização. Vale destacar que as mudanças estruturais e a reorganização molecular dos circuitos neuronais continuam até o final da infância e adolescência, paralelamente ao surgimento da cognição de ordem superior e o comportamento complexo (SILBEREIS et al., 2015).

O processo de sinaptogênese é marcado pela formação das sinapses, um tipo de comunicações célula-célula que permite o controle da transferência de sinais químicos ou elétricos entre um neurônio pré-sináptico e um alvo pós-sináptico. Um funcionamento adequado das sinapses é pré-requisito para todo o funcionamento neuronal, e sua formação bem como sua regulação influenciam na aquisição e no armazenamento da informação (BALDWIN; EROGLU, 2017; HAMI et al., 2018).

A formação das sinapses é um processo complexo que envolve diversas etapas, desde a orientação do axônio e do dendrito, combinação e estabilização da comunicação, até a eliminação das sinapses de forma ativa. O encontro entre os terminais pré e pós-sinápticos dependem de proteínas de membrana, como: as moléculas de adesão de células sináptica (SynCAMs); proteínas pertencentes à família das moléculas de adesão celular (CAMs); proteínas estruturais como as caderinas e teneurinas; Fator de crescimento epidermal (EGF); e o par neurexina-neuroglia (PETZOLDT; SIGRIST, 2014).

De maneira geral, o encontro dos axônios e dendritos se dá em um ambiente com diversas possibilidades de conexão, sendo formados botões sinápticos funcionais e não funcionais. Após sua verificação, as sinapses não funcionais são eliminadas de maneira ativa pelas células da glia.

A ontogênese do SNC dos roedores é diferente da dos humanos, uma vez que os roedores possuem um desenvolvimento pós-natal (FIGURA 2) considerável em relação ao humano. As duas primeiras semanas do período pós-natal de roedores equivalem ao terceiro trimestre de gestação em humanos. Esse período caracteriza-se por um rápido crescimento encefálico incluindo arborização dendrítica, crescimento axonal, mielinização e pico dos processos de sinaptogênese, gliogênese e maturação da neurotransmissão (RICE; JR, 2010).

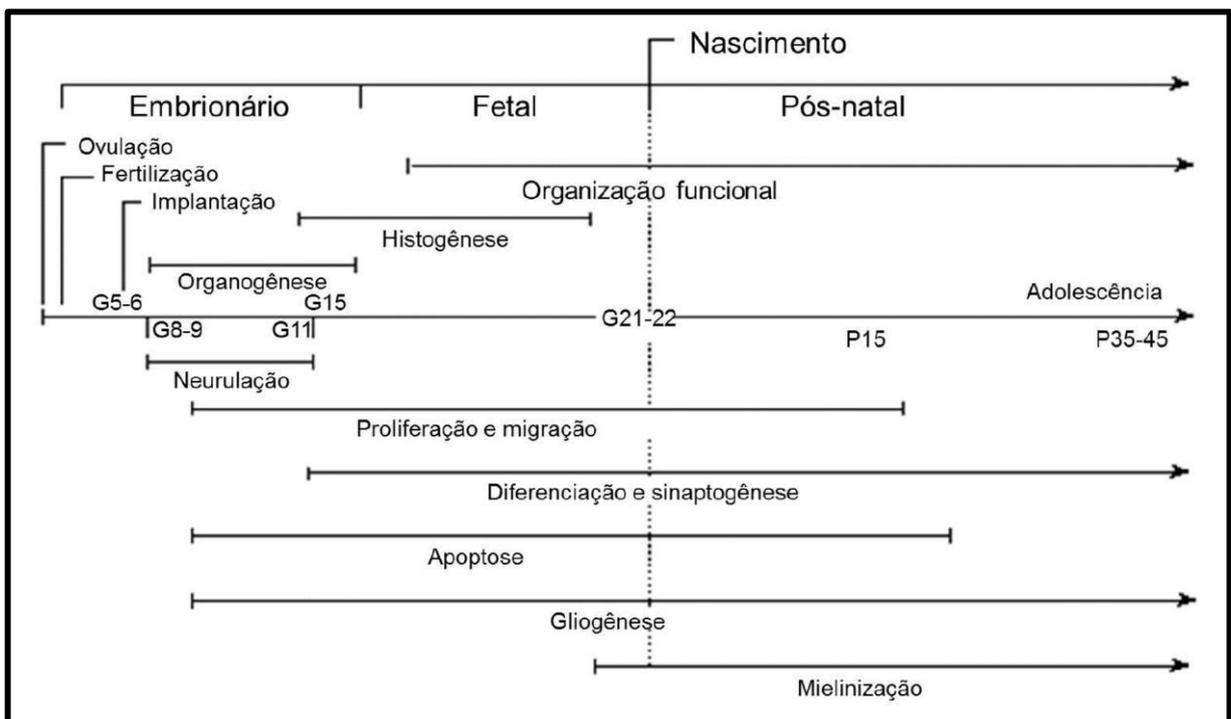


Figura 2: Decurso temporal de alguns processos do desenvolvimento do SNC em roedores. Tempo expresso em dias gestacionais (G) e pós-natal (P). (Adaptado de RICE; JR, 2010).

1.1.2. Surgimento das células da glia

As células da glia correspondem às principais células inflamatórias do SNC. Dentre elas temos os astrócitos e as células da microglia. Conhecida como o macrófago residente do SNC, a célula da microglia possui sua origem na vida embrionária (PRINZ; PRILLER, 2014).

Derivadas de duas linhagens celulares diferentes, saco vitelínico e de células tronco hematopoiéticas, as células da microglia migram para o SNC entre o 9º e 11º dia gestacional dos camundongos. Sua migração precede o aparecimento dos astrócitos, que tem sua diferenciação iniciada no 15º dia gestacional, correspondendo com o pico de neurogênese (13º e 15º dia gestacional). Isto ocorre pois há o aumento da liberação de cardiotrofina-1 pelos neurônios e de IL-6 pelas células da microglia, os principais fatores responsáveis pela diferenciação dos glioblastos derivados do ectoderma neural em astrócitos (GINHOUX et al., 2013; MACHT, 2016) (FIGURA 2).

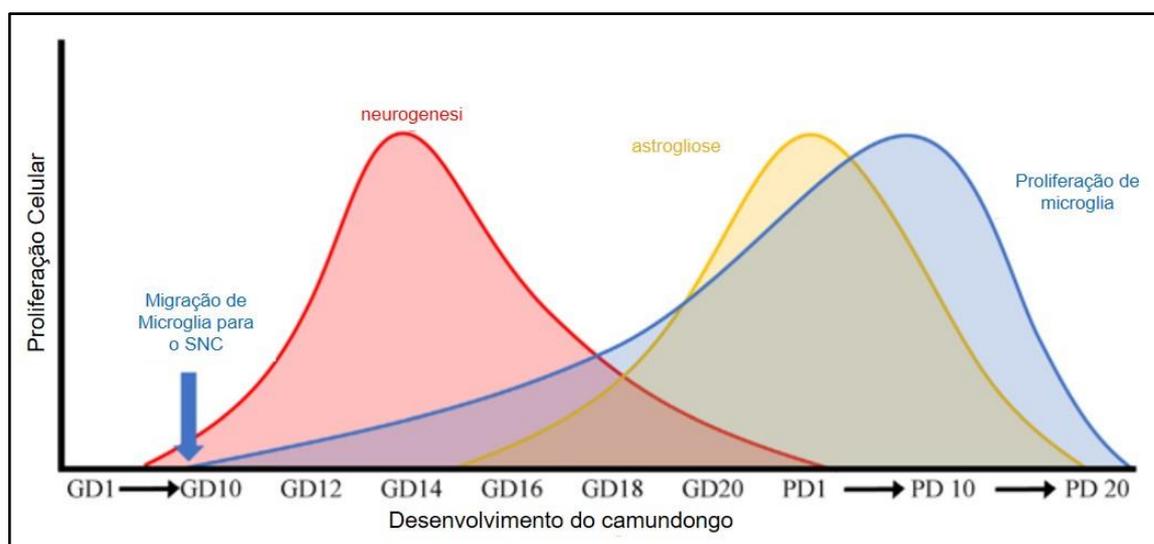


Figura 3: Proliferação/Migração de neurônios, micróglia e astrócitos. Em camundongos, o pico de neurogênese ocorre no 14º dia gestacional (GD14); astrogliose tem seu pico poucos dias após o nascimento sendo nos dias pós-natal 2 e 3 (PD2, PD3); já as células da micróglia migram para o encéfalo no 9º dia gestacional (GD9) e tem sua expansão ao longo de todo o desenvolvimento. (Adaptado de MACHT, 2016).

Neste período, as principais funções da microglia são: (i) angiogênese; (ii) poda sináptica; (iii) fagocitose de células mortas; (iv) remodelamento sináptico (STREIT; MRAK; GRIFFIN, 2004). Durante o desenvolvimento, a microglia passa do estágio ameboide com poucas ramificações, para uma célula de maior complexidade com aparecimento de ramificações no período perinatal para finalmente chegar a uma célula completamente desenvolvida e altamente ramificada no período pós-natal (FIGURA 3). Vale destacar que suas alterações correspondem às modificações no tecido do SNC, como declínio na “apoptose de desenvolvimento”, formação de árvores dendríticas e sinaptogênese (EYO; DAILEY, 2013).

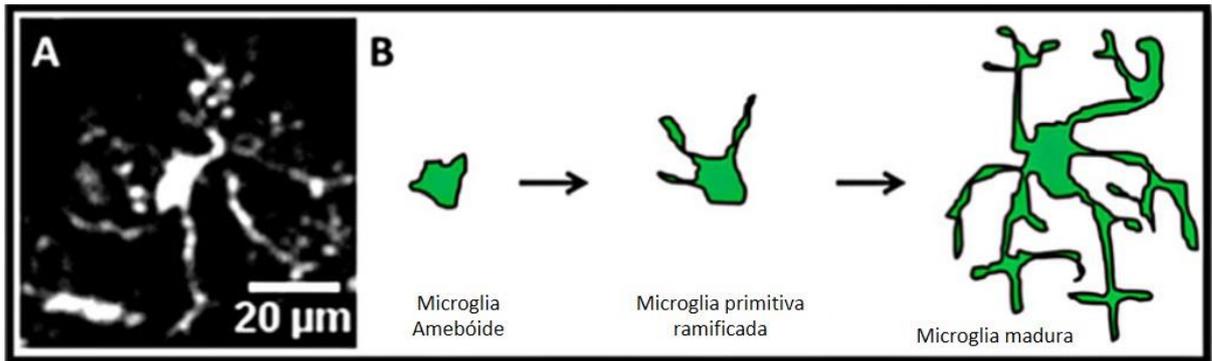


Figura 4: Ramificação da microglia do desenvolvimento até a vida adulta. A) Microglia de hipocampo de camundongo neonato, demonstração de um núcleo e suas ramificações. B) Representação esquemática de ramificação progressiva da microglia do desenvolvimento à vida adulta (Adaptado de EYO; DAILEY, 2013)

Por sua vez, os astrócitos tem um papel na homeostase neural durante o seu desenvolvimento, uma vez que auxiliam no processo de formação, manutenção e eliminação das sinapses, neuroproteção e formação da matriz extracelular (MACHT, 2016).

Nas primeiras fases da neurogênese o contato célula-célula entre os astrócitos e os neurônios é o fator chave para o desenvolvimento das sinapses, porém com o desenvolvimento e maturação das células os neurônios passam a responder à fatores liberados pelos astrócitos. Um exemplo que podemos citar é a formação das sinapses glutamatérgicas, na qual a liberação de trombospondinas é responsável pela formação estrutural da sinapse, a citocina $TNF\alpha$ auxilia no recrutamento dos receptores AMPA e os fatores neurotróficos, como o ADNF, são os responsáveis pelo recrutamento dos receptores NMDA (ALLEN, 2014).

Assim como as células da microglia, os astrócitos tem um papel importante na eliminação do excesso de sinapses durante o desenvolvimento, podendo ser de maneira direta, através da fagocitose de debris de axônios (CAHOY et al., 2008) ou indireta pela liberação de $TGF-\beta$. Este é capaz de induzir a expressão da proteína iniciadora da cascata do complemento o C1q, quando expressa por neurônios este sinaliza uma sinapse fraca e portanto recruta os componentes da cascata do fator C3, sendo portanto reconhecidos pela microglia (C3R) levando a fagocitose neuronal (BIALAS; STEVENS, 2013).

1.2. Neuroinflamação

Dentre as funções das células da glia, uma que vem se destacando nos últimos anos é a capacidade de desenvolver uma resposta inflamatória. Essa resposta tem por base a produção de citocinas e quimiocinas para comunicação entre as células gliais e neurônios, bem como para com as células do sistema imune periférico. O processo neuroinflamatório deve ser bem regulado, uma vez que o seu desbalanço pode acarretar em diminuição de complexos proteicos, menor reparo tecidual e principalmente maior suscetibilidade a infecções quando esta resposta está diminuída. Por sua vez, uma resposta inflamatória exacerbada também possui caráter deletério, uma vez que pode causar dano tecidual por morte de células neuronais pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , e aumento da produção de óxido nítrico (NO) e de espécies reativas do oxigênio (ROS).

As principais características do desbalanço da resposta neuroinflamatória consistem em alterações da barreira Hematoencefálica (BHE) e mudanças no perfil de citocinas das células da glia culminando no desenvolvimento/agravamento de doenças neuroinflamatórias como acidente vascular cerebral e neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer e a Esclerose Múltipla.

1.2.1 Alterações inflamatórias da Barreira Hematoencefálica

Podemos dividir a caracterização da BHE em dois aspectos: o histológico e o molecular. Histologicamente, a BHE é composta por uma fina e contínua camada de glicocalix em um epitélio não fenestrado com baixa atividade vesicular e ligados pelas *tight junctions*, além de duas membranas basais (membrana basal) e os pés astrocitários. Já ao nível molecular, a BHE é composta por ectoenzimas, receptores e transportadores que regulam o tráfego de substância pela barreira (VARATHARAJ; GALEA, 2016).

Desta forma, a BHE auxilia o sistema nervoso em: (i) manter os diferentes compostos iônicos em concentrações funcionais; (ii) manter um *pool* de neurotransmissores; (iii) minimizar as concentrações de proteínas para que não haja proliferação celular em excesso; (iv) minimizar o dano neuronal por diminuir a exposição aos agentes tóxicos; (v) reduzir o tráfego de células e moléculas

inflamatórias para minimizar a inflamação local (KIM et al., 2012; VARATHARAJ; GALEA, 2016).

Da mesma maneira que diferenciamos a composição estrutural da BHE, podemos separar as alterações causadas por uma inflamação sistêmica em dois tipos, as modificações com e sem ruptura da barreira, dependendo da presença ou não de alterações físicas (KIM et al., 2012).

As alterações com ruptura de barreira podem ser encontradas em diversas condições, uma vez que não são patógenos específica. Estas possuem como características: alterações visíveis em níveis histológicos e anatômico, alterações nas *tight junctions*, dano endotelial, desnaturação do glicocálix, aumento de tráfego vesicular e quebra dos limites gliais (FIGURA 5) (VARATHARAJ; GALEA, 2016).

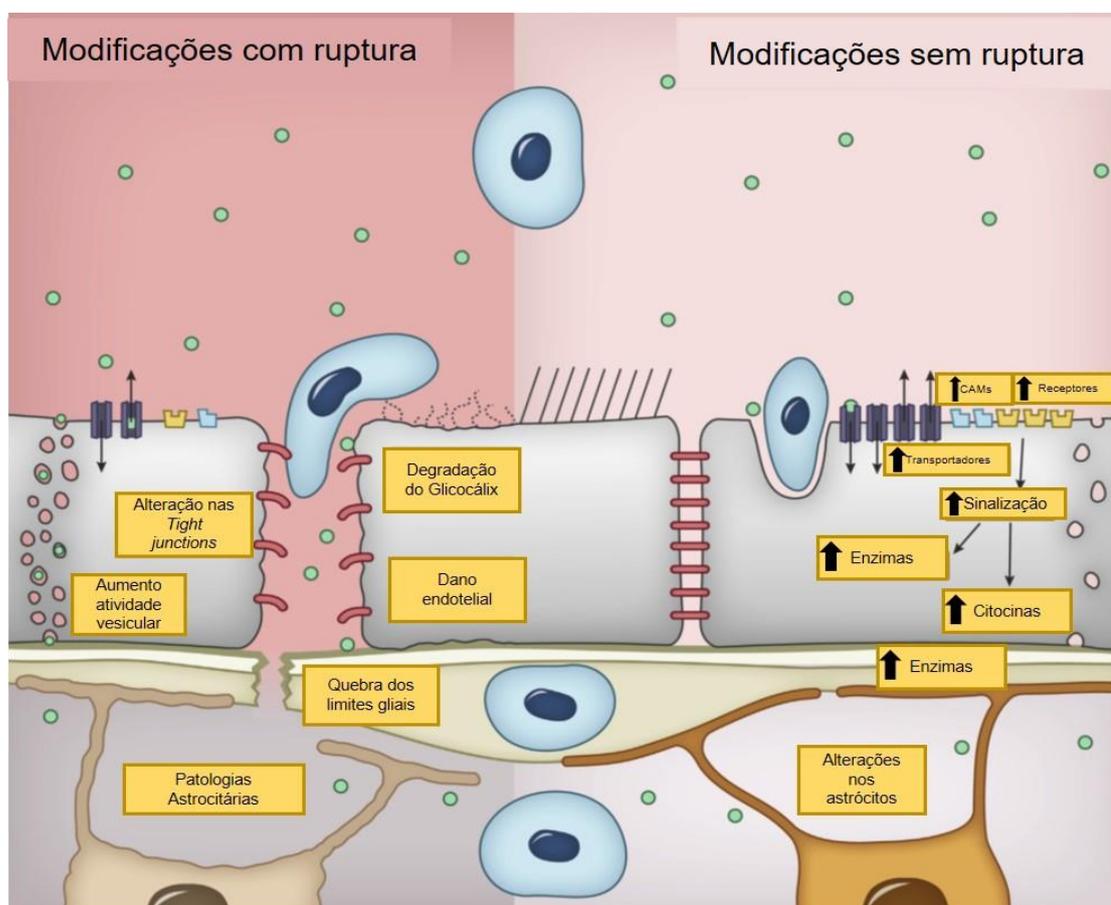


Figura 5: Esquema ilustrativo de alterações inflamatórias na barreira hematoencefálica. Representação da alteração de barreira com e sem rompimento durante uma inflamação sistêmica. As proporções não têm intenção de ser realísticas. CAMs – Moléculas de adesão celular. (Adaptado de VARATHARAJ; GALEA, 2016).

Já as alterações sem rompimento da barreira são comumente patógeno específicas e apresentam características opostas; não apresentam alterações estruturais uma vez que as modificações ocorrem ao nível molecular; há o aumento da produção de citocinas pelas células endoteliais; além da *upregulation* dos receptores e transportadores endoteliais. Mais ainda, ocorre alterações das células astrocíticas e por fim aumento da entrada dos patógenos desencadeando o reconhecimento dos patógenos pelas células da microglia bem como sua ativação (FIGURA 5) (VARATHARAJ; GALEA, 2016).

1.2.2. Alterações inflamatórias nas células da glia

Funcionando como a primeira linha de defesa, as células da microglia “percorrem” o parênquima neural se comunicando com neurônios e endotélio, em busca de perturbações da homeostase local. Quando seus receptores detectam padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) ou dano (DAMPs), a microglia se ativa e muda sua morfologia de espalhada e ramificada para uma célula amebóide, facilitando assim seu deslocamento pelo parênquima e chegada no local do dano (HARRY; KRAFT, 2012).

Vale destacar que além das alterações morfológicas, quando ativadas, as células da microglia passam a secretar fatores pro-inflamatórios como óxido nítrico (NO), espécies reativas do oxigênio (ROS), prostaglandina E2 e citocinas como TNF α , IL-6 e IL-1 β (KRAFT; HARRY, 2011; LEE, 2013).

Dependendo dos sinais liberados no microambiente as células da microglia podem se ativar em duas linhas diferentes: os classicamente ativados (M1) e os alternadamente ativados (M2). O fenótipo M1 é reconhecido por expressar diversos fatores pró-inflamatórios, como TNF α , IL-1, IL-6, espécies reativas do oxigênio e nitrogênio, sendo desta forma um potente fenótipo microbicida. Já o fenótipo M2 possui uma característica mais regulatória e reparadora, liberando fatores como arginase 1, IL-10 e chitinase-3-like3 (PRINZ; PRILLER, 2014).

Estes dois fenótipos são intercambiáveis, envolvendo neste processo diversos fatores de transcrição como o sinal de tradução e ativação de transcrição (STATs), fator regulador de interferon (IRFs), fator nuclear κ B (NF- κ B), proteína ativadora 1 (AP 1), *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR- γ) e proteína responsiva de

cAMP (CREB). Estes fatores de transcrição transcrevem citocinas intercambiáveis e regulam a polarização M1-M2 (FIGURA 6) (LIU et al., 2014b).

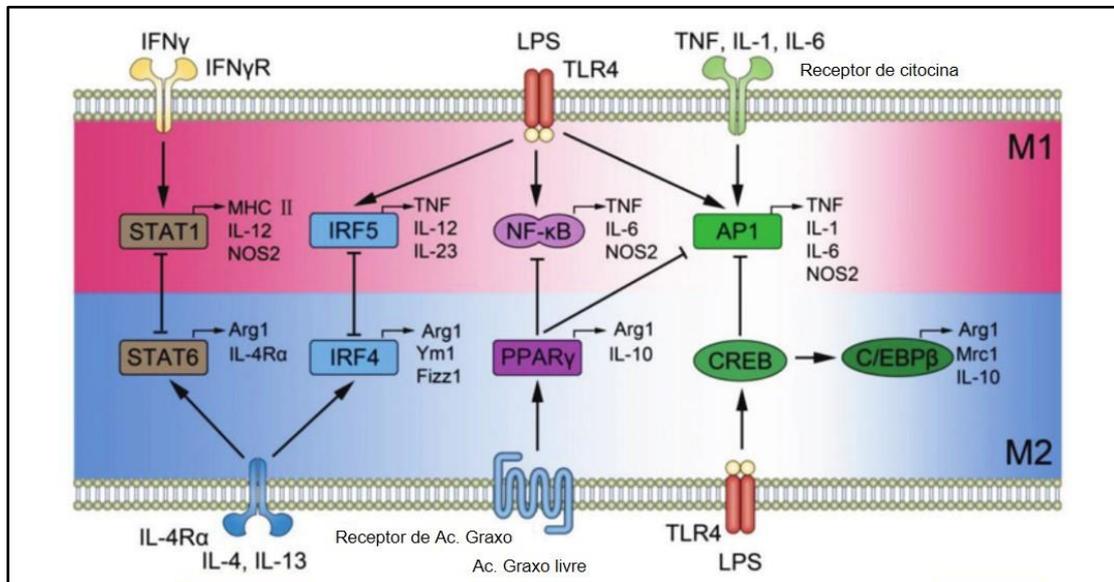


Figura 6: Vias de sinalização da polarização de macrófago. A figura ilustra diversos mecanismos para polarização dos macrófagos e a regulação entre M1 e M2. Estes incluem ativação de STAT1 por receptor de IFN γ , aumento de NF- κ B, IRF5 e AP1 via TLR4, aumento de AP1 via receptor de citocina, ativação de STAT6 e IRF4 via receptor de IL-4, aumento de PPAR γ via receptor de ácido graxo, e aumento de CREB via TLR4. O *feedback* regulatório é realizado pela relação STAT1-STAT6, IRF4-IRF5, NF- κ B-PPAR γ , AP1-CREB, AP1-PPAR γ . Estes mecanismos são de extrema importância na iniciação, desenvolvimento e fim do processo inflamatório. (Adaptado de LIU et al., 2014).

As células da microglia além de auxiliarem na indução do processo inflamatório também atuam como células apresentadoras de antígeno (APC), ou seja, são capazes de ativar linfócitos T e iniciar a resposta imune adaptativa. Para que isto ocorra ela precisa apresentar algumas características específicas como o complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHCII), moléculas co-estimulatórias e de adesão, bem como receptores e mediadores solúveis como citocinas e quimiocinas (XIAO; LINK, 1999).

Para que a célula da microglia possa expressar estes fatores é necessário que ela esteja ativada, desta forma, uma ativação via os receptores de reconhecimento de padrões, como é o caso da ligação do receptor semelhante a toll 4 (TLR4) ao lipopolissacarídeo (LPS), polariza a célula para o perfil M1 aumentando a expressão de fatores como MHCII, CD80 e CD86 que são moléculas co-estimulatórias responsáveis pela comunicação das APCs com os linfócitos (EWING et al., 2013).

Além de ativar os linfócitos, os produtos liberados pela microglia ativada são capazes de influenciar outras células como por exemplo os astrócitos, cuja ativação pode mudar o micro ambiente neuronal com modificações nas concentrações de neurotransmissores à morte celular por aumento de citocinas inflamatórias (CEKANAVICIUTE; BUCKWALTER, 2016; XIAO; LINK, 1999).

No sistema nervoso adulto, os astrócitos exercem diversas funções relacionadas tanto com a manutenção das sinapses quanto com a proteção do sistema frente a uma agressão externa. As principais funções dos astrócitos são (i) formação dos pés astrocitários na barreira hematoencefálica; (ii) tamponamento das sinapses; (iii) célula responsiva ao sistema imune (CEKANAVICIUTE; BUCKWALTER, 2016).

Assim como as células da microglia, os astrócitos podem ser ativados em dois fenótipos diferentes: A1 e A2. Os astrócitos A1 são ativados pelas células da microglia do tipo M1, pela liberação de citocinas como IL-1 α e TNF α . Após sua ativação eles perdem a maior parte de suas funções fisiológicas e ganham uma nova função neurotóxica, levando à morte por apoptose de neurônios corticais e motores além de oligodendrócitos maduros e diferenciados (LIDDELOW et al., 2017).

Por outro lado, os astrócitos do tipo A2 são considerados protetores, uma vez que aumentam a transcrição de proteínas neurotróficas. Este fenótipo é ativado principalmente por dano tecidual, na qual fatores como morte celular, acidose, hipóxia e sinais imunes aumentam a transcrição de CLCF1, LIF, IL-6 e trombosponina que auxiliam na formação de novas sinapses, reparo da barreira hematoencefálica, diminuição da migração de células imunes além de atenuar o processo de morte neuronal (ZAMANIAN et al., 2012).

Em resumo, quando há dano ao SNC células residentes como os astrócitos e as células da microglia são ativadas e acabam por recrutar células imunes periféricas como neutrófilos, monócitos e linfócitos para montar uma resposta neuroinflamatória. Sendo assim a neuroinflamação representa a resposta coordenada frente ao dano tecidual, podendo ser benéfica, porém sua persistência pode induzir uma injúria secundária dando início ao aparecimento de doenças neurodegenerativas (KRAFT; HARRY, 2011; PRINZ; PRILLER, 2014; RANSOHOFF, 2016).

1.2.3. Neuroinflamação e o surgimento de doenças

Conhecido como “sítio imunoprivilegiado” o SNC era assim denominado devido principalmente a presença da BHE que formava uma barreira entre as células do SNC e as da periferia. Este conceito, entretanto, vem se modificando com o passar do tempo. Hoje sabe-se que células imunes ativadas são capazes de transpassar esta barreira (LOUVEAU; HARRIS; KIPNIS, 2015).

O grupo de Jonathan Kipnis (LOUVEAU et al., 2015) demonstrou que a interação entre os sistema nervoso e imune está mais próximo do que se imaginava, ao publicar sobre a presença de vasos linfáticos recobrimdo a membrana dura-mater. Estes vasos os responsáveis por drenar macromoléculas para os linfonodos cervicais profundos, bem como facilitar a transmigração de células imunes para o parênquima cerebral. Em 2018, o mesmo grupo demonstrou que o bloqueio desses vasos linfáticos acarreta em acúmulo de moléculas com a proteína β -amiloide e conseqüentemente, diminuição das funções cognitivas dos animais testados (MESQUITA; FU; KIPNIS, 2018). Estas descobertas trazem uma nova luz para as doenças neuroinflamatórias e neurodegenerativas.

A cronicidade da neuroinflamação, e conseqüentemente a ativação das células da microglia e astrócitos, é um componente fundamental no estabelecimento, perpetuação e resolução de doenças neurodegenerativas (STREIT; MRAK; GRIFFIN, 2004). Já foi demonstrado em diversos trabalhos que as células da microglia se acumulam em lesões de diversas doenças neurodegenerativas como é o caso da doença de Alzheimer, de Parkinson e Esclerose Múltipla, tendo tanto um papel protetor quanto degenerativo (SUZUMURA, 2013).

Existem diversos processos em que a neuroinflamação pode influenciar negativamente, dentre eles a inibição da neurogênese hipocampal associado diretamente à doença de Alzheimer. Quando a microglia é ativada, por exemplo por LPS, esta libera citocinas como IL-6, TNF α e IL-18 que levam a morte de precursores neuronais (NPCs) e, portanto à uma menor diferenciação celular e conseqüentemente um aumento no componente demencial da doença (LYMAN et al., 2014a).

Outro ponto chave é a depuração da placa β -amiloide. Principal achado neuroanatômico que caracteriza a doença de Alzheimer, diversos estudos mostram que a célula da microglia é capaz de fagocitar estas placas, porém de uma maneira

ineficaz ou inadequada com o passar da idade. Ao fagocitar as placas β -amiloide, a microglia se ativa e libera citocinas e quimiocinas que geram neuroinflamação. Vale destacar que na doença de Alzheimer há um constante depósito de β -amiloide e portanto uma constante ativação das células da microglia (STREIT; MRAK; GRIFFIN, 2004).

Na doença de Parkinson, o processo de neuroinflamação é parte integrante da progressão da doença, uma vez que agregados de α -sinucleína podem ativar as células da microglia levando às alterações morfofuncionais, aumento da proliferação e liberação de espécies reativas de oxigênio e citocinas. O aumento destes mediadores inflamatórios pode recrutar leucócitos periféricos e atuar sobre os neurônios levando à morte celular que gera mais inflamação, resultando em um ciclo vicioso de inflamação e morte neuronal (ROCHA; DE MIRANDA; TEIXEIRA, 2015; WANG; LIU; ZHOU, 2015)

Em doenças autoimunes, a relação da inflamação crônica com a progressão da doença é facilmente relacionada. Na Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), modelo murino para a Esclerose Múltipla, as células residentes não só interagem com neurônios lesionados, mas também com células imunes provenientes da periferia reativando-as e levando o processo inflamatório para uma resposta mais elaborada em um ciclo de auto regulação positiva aumentando o dano tecidual e perpetuação da doença (SHEMER et al., 2015).

Alguns fatores são descritos como responsáveis por este constante estado de inflamação, dentre eles podemos destacar alterações genéticas e fatores ambientais como a exposição à fumaça do cigarro (GOLDSTEIN; KOPIN, 2007; MEDZHITOV, 2008).

1.3. TABAGISMO

1.3.1. Epidemiologia

Segundo o Atlas do Tabaco publicado em 2015, um total de 820 milhões de pessoas são fumantes no mundo, e este número tende a crescer. Apesar da implantação de políticas públicas que levaram à redução do número de fumantes em países como Brasil, Reino Unido e Austrália, o aumento do consumo em um único

país, a China, fez com que este número se mantivesse elevado (FIGURA 7) (INGLE; BAKLAND; SCOTT, 2015).

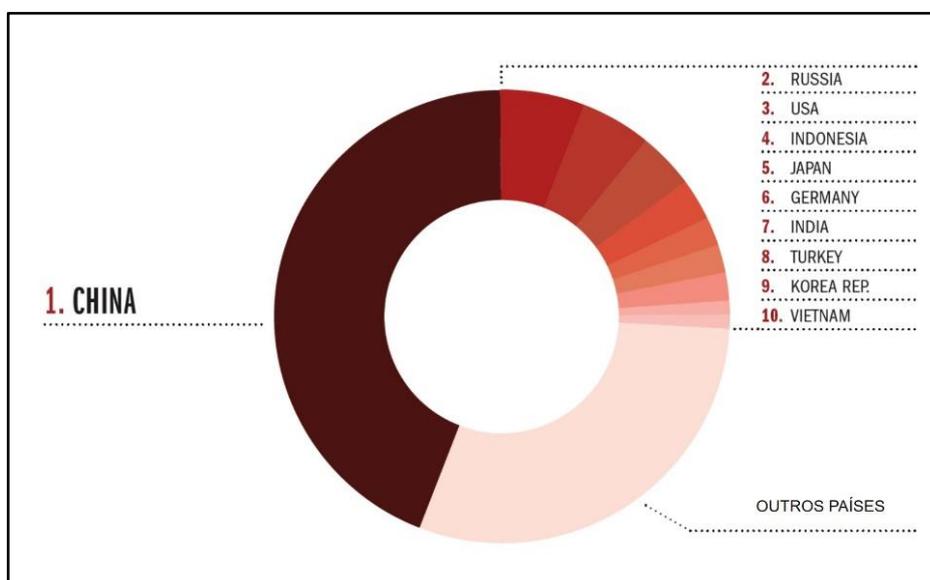


Figura 7: Top 10 - países com maior consumo de cigarro em 2014 (Adaptado de INGLE; BAKLAND; SCOTT, 2015)

Mesmo com a redução do número de fumantes sendo expressiva durante estes anos, houve um aumento do consumo de outras formas de nicotina como por exemplo o cigarro eletrônico que mostrou um aumento de 900% de 2011 a 2015 nos estudantes de ensino médio, representando uma nova porta de entrada à dependência (WIENCEK et al., 2019).

Existe uma grande preocupação com a sobrevivência de indivíduos tabagistas, o Atlas do Tabaco aponta que para cada 10 cigarros fumados diariamente há uma diminuição de 5 anos na expectativa de vida e um aumento de 20 vezes no risco de desenvolvimento de câncer de pulmão. Além disso, este mesmo trabalho relata que o tabagismo foi responsável pela morte de mais de 100 milhões de pessoas no século 20 e sugere que este número passará a 1 bilhão no século 21 (INGLE; BAKLAND; SCOTT, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

O tabagismo é um dos fatores agravantes para doenças crônicas não transmissíveis como hipertensão arterial, acidente vascular cerebral, doenças coronarianas, doença pulmonar obstrutiva crônica e câncer, sendo considerado o fator de risco mais importante em homens e o segundo em mulheres (INGLE; BAKLAND; SCOTT, 2015; OMS, 2015).

O reconhecimento de que a expansão do tabagismo é um problema mundial fez com que, em maio de 1999, durante a 52ª Assembleia Mundial da Saúde (AMS), os Estados Membros das Nações Unidas propusessem a adoção do primeiro tratado internacional de saúde pública da história da humanidade, negociado sob os domínios da OMS: a Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco.

Esse tratado articula um grupo de ações baseadas em evidências para responder à globalização da epidemia do tabagismo, onde se tem por objetivo “proteger as gerações presentes e futuras das devastadoras consequências sanitárias, sociais, ambientais e econômicas geradas pelo consumo e pela exposição à fumaça do tabaco, proporcionando uma referência para as medidas de controle do tabaco a serem implementadas pelas partes nos níveis regional, nacional e internacional, a fim de reduzir de maneira contínua e substancial a prevalência do consumo e a exposição à fumaça do tabaco” (INCA, 2011).

1.3.2. Fumo Passivo

Uma das principais diretrizes da Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco é a diminuição da exposição ao fumo passivo, que é definido como a inalação da fumaça de derivados do tabaco, como cigarros e charutos, por indivíduos não fumantes em ambientes fechados. Esta fumaça é denominada poluição tabagística ambiental (PTA) (ALAVANJA et al., 2004; INCA, 2011).

Em seu relatório, a Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou que não existe dose segura para a exposição passiva à fumaça do cigarro. Assim, o fumante passivo sofre os efeitos imediatos da PTA, como irritação nos olhos, manifestações nasais, tosse, cefaleia, entre outros, além dos efeitos a médio e longo prazo, tais como: redução da capacidade funcional respiratória, aumento do risco de aterosclerose, doença pulmonar obstrutiva crônica e câncer de pulmão, boca e laringe, além de câncer de mama em mulheres pré-menopáusicas (OMS, 2015; OPAS, 2008).

A exposição passiva pode ocorrer em diversos locais como: trabalho, restaurantes e principalmente em casa. Na Figura 8 podemos observar que a exposição passiva na própria residência representa mais de 20% no Brasil (INGLE; BAKLAND; SCOTT, 2015). Vale destacar que não somente os adultos estão expostos à PTA, mas também crianças e recém-nascidos.

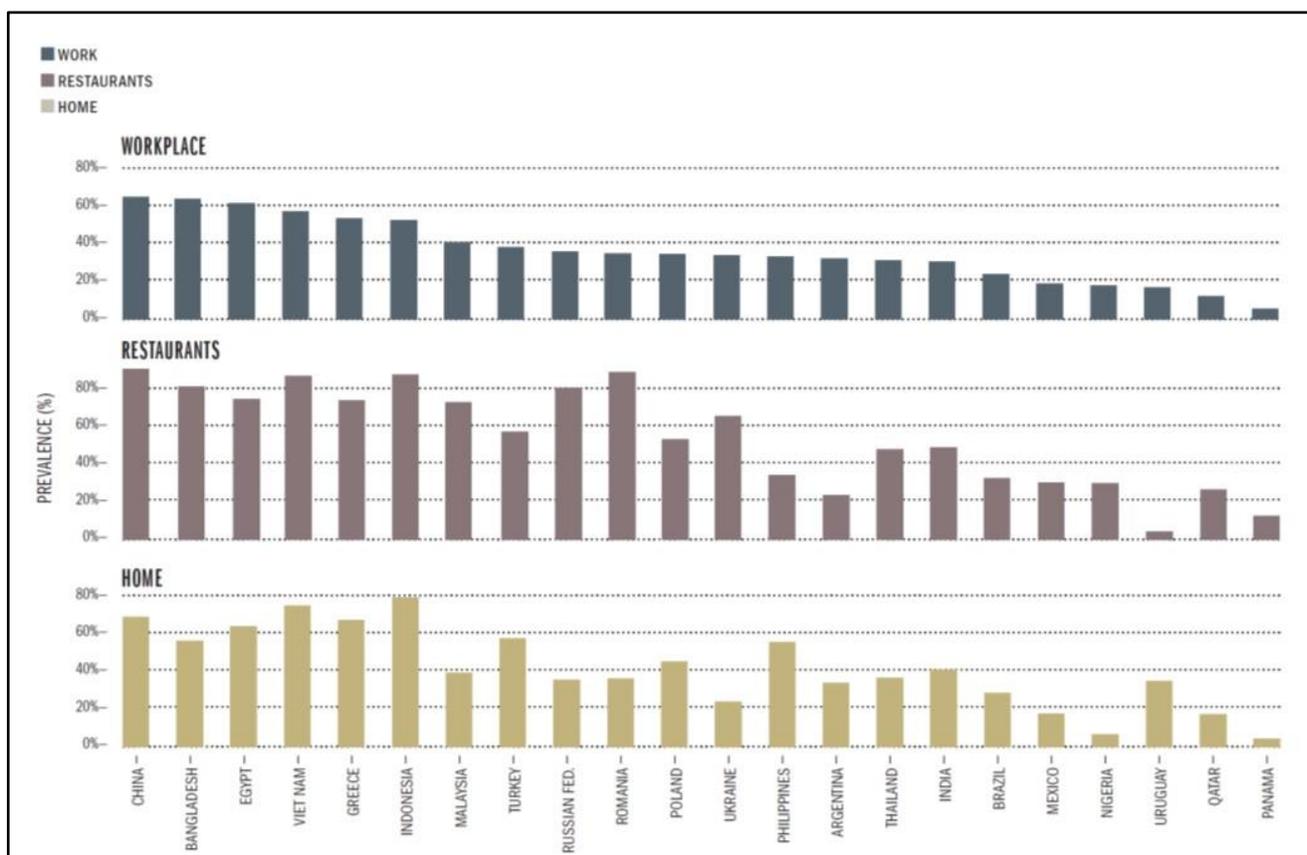


Figura 8: Prevalência da exposição à fumaça do cigarro. Gráfico de indivíduos com idade ≥ 15 anos no período de 2008 - 2013. (Adaptado de INGLE; BAKLAND; SCOTT, 2015)

A criança é o principal fumante passivo em residências de tabagistas, porém, não é a única afetada. Os recém-nascidos, além de inalarem a fumaça do cigarro, são expostos aos componentes da mesma por meio do leite materno (SALMÓRIA; OLIVEIRA, 2008).

Mais de 12 milhões de recém-nascidos são expostos no útero à fumaça do cigarro por ano, sendo que dentre estes mais de 1 milhão são de bebês nascidos nos EUA (NG et al., 2013). No Brasil, KROEFF et al. (2004), revelaram que a cidade de Porto Alegre foi a que apresentou maior índice de fumantes ativas durante a gestação

(31,9%) e a cidade de Manaus a de menor índice (7,2%). Já a cidade de São Paulo apresentou 16,1% de gestantes fumantes.

Estes números são preocupantes uma vez que o feto é suscetível às consequências imediatas e tardias de uma gestante fumante, uma vez que algumas substâncias presentes na circulação materna podem atravessar a placenta (SALMÓRIA; OLIVEIRA, 2008).

Conhecida como a interface imunologicamente ativa entre o feto e a mãe, a barreira placentária está sujeita às influências externas, as quais podem afetar o feto. A privação de oxigênio causada pela exposição à fumaça do cigarro, por exemplo, é capaz de alterar a proliferação das células citotrofoblásticas da placenta nos períodos críticos do desenvolvimento embrionário e acarretar um aumento de doenças imunológicas na vida pós-natal como a asma (PRESCOTT, 2008).

A exposição pré-natal aos constituintes da fumaça do cigarro pode retardar o desenvolvimento do feto, aumentar o risco da síndrome de morte súbita infantil (SIDS) e facilitar o desenvolvimento de doenças, como dependência, obesidade e distúrbios cardiometabólicos, além de alterar a resposta imune (LEE; PAUSOVA, 2013).

LIN et al. (2017), mostrou uma correlação entre o comportamento hiperativo de crianças chinesas expostas à fumaça do cigarro durante o período gestacional. Já o grupo de NG et al. (2006), observou que a exposição à fumaça central do cigarro em fêmeas prenhes da linhagem de camundongos B6C3F1, do 4º dia gestacional até o parto por 5 dias na semana durante 4 h/dia, diminui a resistência dos neonatos contra células de tumor transplantadas, além de reduzir a atividade de linfócitos T citotóxicos. Em 2013, este mesmo grupo, mostrou que a diminuição da resistência às células de tumor transplantada ocorre devido ao aumento da formação de células CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ (Treg) no timo de uma maneira tempo dependente, diminuindo assim a capacidade proliferativa dos linfócitos T citotóxicos (NG et al., 2013).

1.3.3. Fumaça do Cigarro

A fumaça do cigarro é composta por mais de 7.000 substâncias, entre elas a nicotina, o monóxido de carbono, a amônia, o benzeno, as nitrosaminas e os radioisótopos do chumbo e polônio, que contribuem para seu potencial carcinogênico. Vale ressaltar que substâncias como a nicotina e o benzeno possuem alta

lipossolubilidade, atravessando com facilidade a barreira hematoencefálica, favorecendo assim sua entrada no SNC (DUARTE et al., 2006; INGLE; BAKLAND; SCOTT, 2015).

A PTA é composta pela fumaça central e a fumaça lateral. A fumaça central é exalada após a tragada, passando pelos filtros do cigarro e pelos pulmões do fumante. A temperatura de queima responsável pela formação da fumaça central é de cerca de 950°C. Já a fumaça lateral é a grande responsável pela PTA, uma vez que constitui 80% de toda a atmosfera tabagística e é gerada entre as tragadas por meio da queima lenta do cigarro em temperaturas mais baixas (350°C) que a central. A fumaça lateral é mais prejudicial que a central, uma vez que não passa por nenhum tipo de filtro (cigarro ou pulmão), além de ser formada por uma combustão incompleta, apresentando maiores quantidades de substâncias tóxicas e carcinogênicas por unidade de massa (MELLO; PINTO; BOTELHO, 2001; OPAS, 2008; SALMÓRIA; OLIVEIRA, 2008).

A composição de cada cigarro varia de acordo com o tipo de folha de tabaco empregada, além de sua manufatura, região de plantio e das técnicas de processamento e fermentação, fazendo com que cada cigarro queime de uma maneira particular e produza uma fumaça com diferentes proporções de substâncias tóxicas (MELLO; PINTO; BOTELHO, 2001).

Poucos trabalhos estudam a influência da fumaça do cigarro na formação do SNC. Sabe-se que a exposição pré-natal aos componentes da fumaça do cigarro leva ao mal desenvolvimento do SNC, promovendo alterações comportamentais, motoras, sensoriais e cognitivas. A possível explicação desse comprometimento no desenvolvimento do SNC inclui alterações epigenéticas nos genes Hox, responsáveis pelo direcionamento neuronal (MORMILE et al., 2013).

O enfoque do nosso grupo de pesquisa tem sido a avaliação dos efeitos da exposição à fumaça do cigarro durante o início do período pós-natal, ou seja, no período crítico de desenvolvimento do SNC. Até o momento, pudemos observar que a fumaça do cigarro induz um estado de estresse oxidativo em diversas regiões encefálicas, além de mostrar prejuízos ao processo de mielinização e diminuição das proteínas Olig-1 e proteína básica de mielina. Também observamos que há prejuízos nos processos de aprendizagem e memória na infância e alguns desses prejuízos

mantiveram-se na adolescência e na fase adulta (LOBO TORRES et al., 2012; TORRES-PACHECO, 2013; TORRES et al., 2015a, 2015b).

1.3.4. **Exposição à fumaça do cigarro e o surgimento de doenças inflamatórias**

Poucos trabalhos têm como objetivo estudar o efeito da fumaça do cigarro na resposta inflamatória do SNC, sendo o principal foco o pulmão, já que este é o primeiro órgão que entra em contato com a fumaça. JIANG et al., (2010) observaram que a exposição à fumaça do cigarro durante 2h ao dia, por 16 dias consecutivos, aumentou as células inflamatórias no lavado bronco alveolar (BALF), sendo caracterizado principalmente por monócitos e macrófagos. As citocinas também seguiram este aumento, sendo detectadas diferenças nas quantidades de TNF- α , TGF- β , IL-6 e IL-1 β em relação ao controle.

THATCHER et al., (2008) mostraram que camundongos expostos à fumaça do cigarro por 6 vezes na semana, durante 2 semanas, apresentaram aumento das células no BALF, sendo principalmente de macrófagos e neutrófilos. Mais ainda, KARAOGLU et al., (2012) relataram que a exposição de ratas prenhes à fumaça do cigarro leva ao aumento do número de células apoptóticas no pulmão da ninhada, sugerindo uma maior fragilidade do feto à exposição da fumaça do cigarro.

Estudos apontam que a exposição intrauterina à fumaça do cigarro aumentou a sensibilidade pulmonar à asma dos neonatos, justificado pela supressão do fator de transcrição T-bet, aumento da resposta TH2 de linfócitos e maior apresentação do cromossomo 5q 'TH2' e o genótipo GSTM1 nulo, o qual é responsável pelo aumento da transcrição da enzima antioxidante glutationa-S-transferase (PRESCOTT, 2008; SINGH et al., 2011).

Alterações epigenéticas causadas pela fumaça do cigarro tem tido destaque na literatura e essas alterações podem ocorrer de 4 maneiras: (i) dano no DNA e recrutamento das enzimas responsáveis pela sua metilação, as DNA metiltransferases. As substâncias como nitrosamidas e formaldeído, por exemplo, podem causar quebras de cadeia dupla na fita de DNA e assim ativar o mecanismo de reparo, o qual recruta a DNMT1 que adiciona um grupamento metila adjacente à base reparada; (ii) efeito da nicotina na expressão gênica, por meio da diminuição do

fator de transcrição ligado ao AMPc e conseqüentemente diminuição da transcrição de proteínas como as DNMTs; (iii) ativação indireta de fatores ligantes de DNA, impedindo assim a metilação *de novo* e a transcrição genica; (iv) hipóxia, na qual a ativação da HIF-1 α leva a um aumento da enzima metionina adenosil transferase 2A responsável pela síntese do SAM (LEE; PAUSOVA, 2013).

No entanto, pouco se sabe quais genes são alterados pelas substâncias tóxicas presentes na fumaça do cigarro. Os trabalhos encontrados na literatura evidenciam que a fumaça do cigarro é capaz de alterar os genes F2RL3, responsável pela expressão do receptor 4 de protease ativada, a qual está envolvida nos processos de ativação plaquetária, hiperplasia e inflamação; e o gene do receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AHR), que é silenciado após a exposição a este xenobiótico diminuindo assim a taxa de biotransformação dos compostos presentes na fumaça do cigarro (BREITLING et al., 2011; SHENKER et al., 2013).

Além destes genes, a exposição à fumaça do cigarro durante o período gestacional pode hipometilar o gene da CYP1A1 na placenta, facilitando assim a depuração dos compostos que ali chegam. Outros trabalhos nesta mesma linha mostram que a fumaça do cigarro altera o fator induzido de hipóxia HIF-1 α ativando a via do NF- κ B e auxiliando no desenvolvimento do modelo murinho de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (JIANG et al., 2010; MONICK et al., 2012; PRESCOTT, 2008).

Os trabalhos mencionados mostram que a fumaça do cigarro, além de influenciar na resposta imune principalmente em seu órgão alvo, o pulmão, pode modular genes importantes para o desenvolvimento tanto do sistema imune quanto do SNC. Podemos observar um exemplo destes fenômenos no trabalho desenvolvido por KHANNA et al., (2013), eles mostraram que a exposição passiva à fumaça do cigarro por 45 dias provoca aumento de genes pró-inflamatórios como IL-6, IL-1 β e TNF α no SNC de ratos Lewis.

Resultados obtidos previamente em nosso laboratório, mostraram que a fumaça do cigarro aumenta a transcrição gênica de genes relacionados com a inicialização do processo inflamatório, como os receptores responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs o TLR2 e o TLR4, além aumentar a transcrição da iNOS, responsável pelo *burst* oxidativo de NO durante o processo inflamatório, quando desafiado com LPS em regiões como o hipocampo e o estriado (DURÃO, 2014).

Ainda que estes resultados deem o pontapé inicial nas consequências da exposição à fumaça do cigarro no processo de neuroinflamação, não se sabe ainda quais as repercussões de uma exposição gestacional nos processos neuroinflamatórios da prole, uma vez que os filhotes são mais susceptíveis as alterações ambientais durante o seu desenvolvimento, podendo levar a mudanças duradouras. Por este motivo, a hipótese deste trabalho sugere que exposições gestacionais à fumaça do cigarro são capazes de modular a forma que as células da glia respondem a estímulos inflamatórios, podendo assim, acarretar em maiores efeitos deletérios para o SNC.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da exposição gestacional à fumaça do cigarro sobre o processo de neuroinflamação da prole de camundongos C57BL/6 desafiados ou não com LPS.

2.1. Estratégias experimentais

Com o intuito de verificar a influência da exposição à PTA durante a vida intrauterina na ativação da resposta inflamatória, foram utilizadas as seguintes estratégias *“in vivo”*:

- ✓ Avaliação da metilação global do SNC
- ✓ PCR Array para avaliar o perfil de expressão gênica
- ✓ Avaliação da perpetuação das alterações neuroinflamatórias por meio do protocolo de encefalomielite autoimune experimental (EAE)

O passo seguinte foi verificar os mecanismos pelas quais a fumaça do cigarro pode modular a biologia das células da glia. Para tanto, foram utilizadas as seguintes estratégias *“in vitro”*:

- ✓ Quantificação por *cytometry beads array* (CBA) das citocinas IL-1b, IL-6, IL-10, IL-12, TNF α e IFN- γ
- ✓ Avaliação do perfil de ativação celular por meio dos marcadores CD11b, CD80, CD86, GFAP
- ✓ Quantificação de óxido nítrico
- ✓ Avaliação de astrócitos, micróglia e neurônio por imunofluorescência
- ✓ Avaliação da expressão dos genes IL-6, TNF α , IKK, TLR2, IL-10 e iNOS
- ✓ Avaliação da morte celular pela técnica de Anexina e PI
- ✓ Avaliação da metilação global das células da glia
- ✓ Avaliação dos miRNAs 155, 146a e 223 na cultura de células da glia

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desenho experimental e protocolo de exposição

Camundongos C57BL/6 fêmeas, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (comitê de ética CEUA/FCF/486) da Universidade de São Paulo, mantidos em ciclo de 12 horas claro/escuro, com água e comida à vontade, foram alocados de forma a ter duas fêmeas para cada macho durante 24 horas no biotério de manutenção do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Após a detecção do *plug* vaginal (G0) (confirmação de acasalamento) as fêmeas foram expostas à fumaça do cigarro durante o período gestacional, até o dia do nascimento da prole (G21).

A exposição à fumaça do cigarro ocorreu em dois horários, 9:00 e 16:00h, com duração de uma hora cada, conforme protocolo já estabelecido e utilizado em outros trabalhos de nosso laboratório (LOBO TORRES et al., 2012; TORRES et al., 2015b, 2015a). Os animais do grupo controle foram colocados em uma câmara semelhante e inalaram apenas ar sintético.

A exposição à fumaça de cigarro foi realizada dentro de uma câmara de polipropileno (564x385x371mm) acoplada a um sistema Venturi onde um fluxo de ar, dentro de uma tubulação suavemente cônica, produz uma pressão negativa (vácuo) proporcional à velocidade do fluxo e às dimensões da tubulação e, dessa forma, a fumaça do cigarro é direcionada aos animais (FIGURA 10). Foram utilizados os cigarros referência 3R4F produzidos pela Universidade de Kentucky (EUA), que possui composição descrita na Tabela 1. Estes cigarros, desenvolvidos especialmente para pesquisa, garantem uma uniformidade entre as unidades e permitem a comparação entre os diversos estudos realizados por qualquer laboratório de pesquisa (Khanna et al., 2012).

Após o nascimento, a prole foi utilizada no terceiro dia de vida (P3) para o desenvolvimento do trabalho nos protocolos *in vivo* e *in vitro* (FIGURA 9).

Para os experimentos *in vivo*, os animais foram desafiados com 1 mg/Kg de lipopolissacarídeo (LPS) provenientes de *Escherichia coli* (0111:B4; Sigma), via intraperitoneal (i.p.), e eutanasiados após 4 horas para a remoção do encéfalo.

Para os experimentos *in vitro*, foram realizados dois tipos de cultura, a cultura mista enriquecida com neurônios (cultura neuronal) e a cultura mista de células da glia (cultura mista) a partir do encéfalo dos neonatos. Atingida a maturação, as culturas foram estimuladas com 100 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS) provenientes de *Escherichia coli* (0111:B4; Sigma), e, após 24 horas, foram realizados os protocolos.

Assim, foram formados os seguintes grupos experimentais:

Grupo Controle – (CO) – Prole das fêmeas expostas ao ar sintético no período gestacional e submetidos ao desafio com salina (*in vivo*) ou meio (*in vitro*).

Grupo Fumante – (FU) – Prole das fêmeas expostas à fumaça do cigarro no período gestacional e submetidos ao desafio com salina (*in vivo*) ou meio (*in vitro*).

Grupo LPS– (LPS) – Prole das fêmeas expostas ao ar sintético no período gestacional e submetidos ao desafio com LPS (*in vivo* e *in vitro*).

Grupo Fumante + LPS – (FPS) – Prole das fêmeas expostas à fumaça do cigarro no período gestacional e submetidos ao desafio com LPS (*in vivo* e *in vitro*).

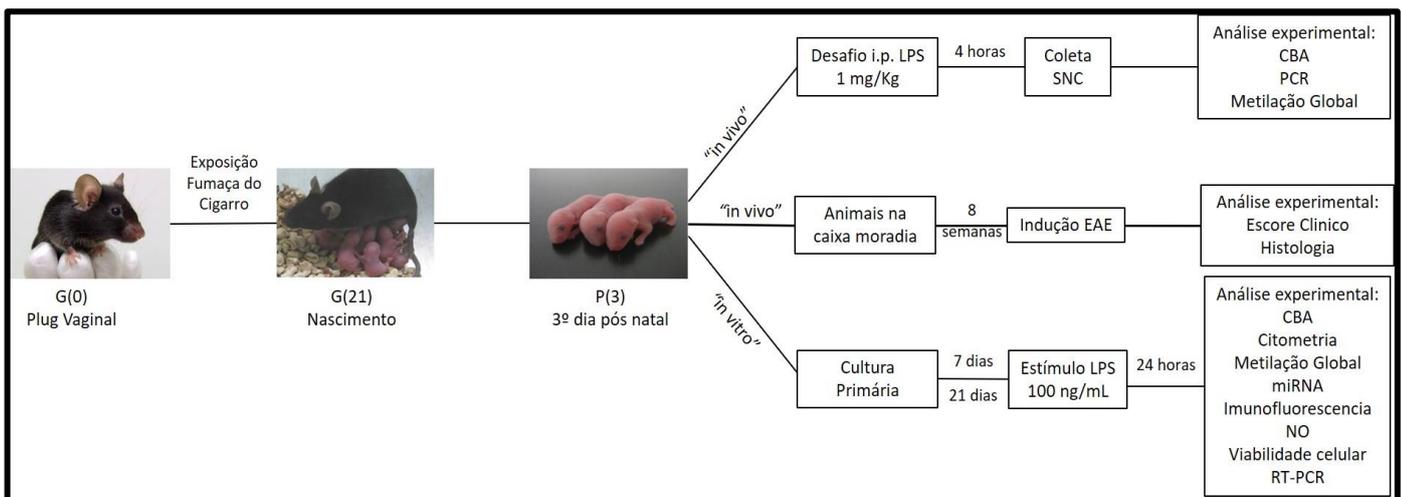


Figura 9: Desenho experimental do projeto. Camundongos fêmea foram expostas desde o *plug* vaginal até a data de nascimento da prole. No terceiro dia de vida pós-natal, estes foram separados para três linhas de trabalho: 1) e 2) *in vivo* e 3) *in vitro*. 1) Os animais foram previamente desafiados com LPS i.p. na dose de 1 mg/kg. Após 4 horas, os camundongos foram eutanasiados e o SNC removido para as análises. 2) Após o desmame os animais foram mantidos em sua caixa moradia por 8 semanas, atingido o período os animais foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ e acompanhados no desenvolvimento da EAE. 3) Os encéfalos foram utilizados para preparação das culturas mista e neuronal. Decorridos de 7 a 21 dias, as mesmas foram estimuladas com LPS 100 ng/mL e, após 24 horas, foram realizados os procedimentos.

Tabela 1: Constituintes do cigarro padronizado 3R4F da Universidade de Kentucky

<i>Constituintes</i>	<i>3R4F (mg/cig)</i>
<i>Nicotina</i>	0,726
<i>Alcatrão</i>	9,4
<i>Monóxido de Carbono</i>	11,9
<i>Benzeno</i>	0,328
<i>Benzopireno</i>	0,0066
<i>Tolueno</i>	0,493
<i>1,3-butadieno</i>	0,236
<i>Acetaldeído</i>	0,4846
<i>Acetona</i>	0,2501
<i>NOx</i>	0,1912
<i>Isopreno</i>	0,1349

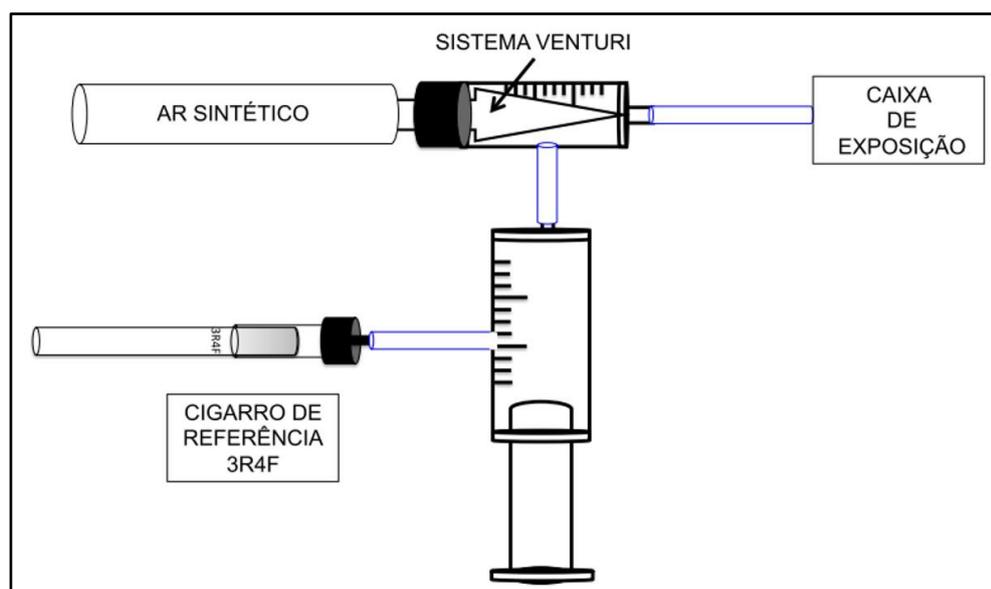


Figura 10: Esquema demonstrativo do sistema venturi. Sistema utilizado na exposição à fumaça do cigarro (ANDRIOLI, 2016)

3.2. Protocolo do período de eutanásia

Para padronização do período de eutanásia realizado após o estímulo com LPS foram utilizadas proles provenientes de animais controle, ou seja, sem a exposição prévia à fumaça do cigarro. Os filhotes foram desafiados com 1 mg/Kg de LPS ou

salina e eutanasiados nos períodos de 1h, 4h, 8h, 12h e 24h após o desafio. O sistema nervoso central foi coletado e processado para a dosagem de citocinas pela técnica de CBA.

3.3. Marcadores biológicos

O controle biológico da exposição foi realizado pela determinação de carboxihemoglobina em sangue total, além das dosagens de cotinina e 3-hidroxicotinina em plasma.

Foram também avaliados os parâmetros de peso das gestantes, peso dos neonatos e consumo de água e ração.

3.3.1. Avaliação do consumo de água, ração e peso dos animais

Para a avaliação do consumo de água e ração foi realizada uma pesagem no dia 0, ou seja, detecção do *plug* vaginal e início das exposições, da quantidade de ração colocada em cada caixa bem como do volume de água em cada bebedouro.

A cada 5 dias foi avaliado o consumo de água e de ração. No 19º dia foi realizada a última medição e a partir dos valores obtidos foi feita uma média do consumo no período por animal por caixa.

As fêmeas prenhes foram pesadas até o 20º dia gestacional sempre antes da primeira exposição do dia. Os neonatos foram pesados, individualmente, apenas no 3º dia de vida, ou seja, no momento da eutanásia.

3.3.2. Determinação da concentração de carboxihemoglobina (COHb)

Para dosagem da COHb, foi utilizado o método de BEUTLER; WEST, (1984) e modificado por MALHEIRO (1991). O princípio do método consiste na redução da hemoglobina com ditionito de sódio formando hemoglobina reduzida (desoxihemoglobina). Este agente redutor reduz todas as formas de hemoglobina (metemoglobina e a oxihemoglobina), exceto a COHb. Os fatores de calibração devem

ser calculados para cada espectrofotômetro e no caso, os fatores obtidos foram: F1=1,2814; F2=0,7672 e F3=1,9170. A técnica utilizada está descrita a seguir.

✓ Determinação dos fatores de calibração:

Em dois tubos de ensaio (A e B), adicionou-se 3,0 mL do hemolisado, preparado pela diluição de 100 µL de sangue total de não-fumante em 12 mL de solução hemolisante (tampão em água na proporção 1:10). No balão A, borbulhou-se CO por 3 minutos enquanto no balão B borbulhou-se O₂ por 15 minutos. Ambos os tubos foram fechados imediatamente. As soluções com 100% de COHb e 100% de O₂Hb foram submetidas à corrente de N₂ por 2,5 minutos. Os tubos foram imediatamente fechados após o borbulhamento e 2,0 mL de cada solução foram diluídos com solução redutora (25 mg de ditionito de sódio em 20 mL de solução tampão) em balões volumétricos de 25 mL. A leitura das absorvâncias das soluções A e B foram realizadas em 420 e 432 nm. Segue cálculo dos fatores F1, F2 e F3.

$$F1 = \frac{\text{Abs Hb}_{\text{red}} 432}{\text{Abs Hb}_{\text{red}} 420} \quad F2 = \frac{\text{Abs COHb} 432}{\text{Abs Hb}_{\text{red}} 420} \quad F3 = \frac{\text{Abs COHb} 420}{\text{Abs Hb}_{\text{red}} 420}$$

✓ Determinação de COHb nas amostras

Em um tubo de ensaio com tampa, adicionou-se 0,1 mL de sangue total e 12 mL de solução hemolisante (tampão KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M pH=6,85 e água, proporção 1:10). Após homogeneização por inversão, 2 a 3 vezes, o tubo foi deixado em repouso por 10 minutos. A seguir, foram diluídos 0,2 mL do hemolisado com 2,3 mL de solução redutora (25mg de ditionito de sódio em 20 mL de tampão KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M pH=6,85). Essa mistura foi deixada em temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura foi realizada em 420 e 432 nm, utilizando como branco a solução redutora. O cálculo da porcentagem de COHb foi realizado da seguinte maneira:

AR: Absorbância relativa

$$\%COHb = \frac{1 - (AR \times F1)}{AR (F2 - F1) - F3 + 1} \times 100 \quad \text{Sendo: } AR = \text{Abs } 420 / \text{Abs } 432$$

3.3.3. Determinação da concentração de cotinina e 3H-cotinina

Está técnica foi realizada em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Maurício Yonamine (FCF USP), na qual as técnicas já se encontram padronizadas

✓ Reagentes e outros materiais

Solventes e sais Merck (Alemanha).

Filtro PVDF 0,22 µm Novanalítica (Brasil).

✓ Padrões

Solução padrão de cotinina, 3-hidroxicotinina e cotinina-d3 foram adquiridos nas concentrações de 1 mg/mL e 100 µg/mL da *Cerilliant Corporation* (Round Rock, Texas, EUA). O padrão deuterado foi utilizado como padrão interno. A partir destas soluções foram preparadas as soluções de trabalho.

✓ Preparo da amostra

Para dosagem de cotinina e 3-hidroxicotinina foram coletados plasmas das fêmeas no final dos 21 dias de exposição à fumaça do cigarro ou ao ar sintético.

A extração das amostras foi baseada no procedimento de precipitação de proteínas. Primeiramente, as amostras foram centrifugadas a 9.878 x g por 10 minutos, e 25 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e adicionado 200 µL de padrão interno de cotinina–d3 na concentração de 450 ng/mL (diluído em metanol com 1% de bicarbonato de amônio). As amostras foram agitadas em vórtex por 10 segundos e novamente centrifugadas à 9.878 x g por 6 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em novo tubo contendo 175 µL de água Milli Q e as amostras foram então filtradas (filtro de seringa PVDF 13 mm de diâmetro com poro de 0,22 µm) e colocadas em um *insert* para injeção de 1 µL no equipamento.

A curva de calibração utilizou plasmas brancos em sua preparação e foi realizada com as concentrações de 100, 250, 450, 650, 850 e 1000 ng/mL.

✓ Dosagem de cotinina e 3-hidroxicotinina

A dosagem de cotinina e de 3-hidroxicotinina em plasma de ratos fêmeas foi realizada por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (LC-

MSMS). Foi utilizado cromatógrafo líquido ACQUITY Ultra Performance LC™ (Waters, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo modelo Quattro Premier XE (Waters, EUA). A fonte de ionização utilizada foi a *electrospray*, operada em modo positivo a 4000 V. Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização (800 L/H), gás secante (450°C) e auxiliar e foi utilizado o gás argônio como gás de colisão (50 L/H). Foi realizado o monitoramento de reações múltiplas (MRM) e as transições iônicas utilizadas para a quantificação das amostras encontram-se na Tabela 2. A separação dos analitos foi feita por meio de uma coluna de fase reversa ACQUITY™ UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 µm; Waters, EUA) e a separação ocorreu sob gradiente (Tabela 3) a uma vazão de 400 µL/minutos, na qual a fase A utilizada foi tampão de bicarbonato de amônio (2 mM) e a fase B foi composta por acetonitrila grau de pureza HPLC.

Tabela 2: Transição iônica de cotinina, 3-hidroxicotinina e cotinina D3

Transição iônica	
Analito	Transição
Cotinina	177 > 79,8
Cotinina D3	180 > 100,7
3-hidroxicotinina	193 > 133,8

Tabela 3: Gradiente de concentração da fase B. Equipamento ACQUITY Ultra Performance LC™ por tempo de injeção.

ACQUITY™ UPLC BEH C18	
Tempo (min)	Fase B (%)
0	2
0,2	2
0,8	1
1,3	100
14,2	100
14,3	2
17,5	2

3.4. Cultura Primária

As culturas celulares foram obtidas conforme o protocolo estabelecido por SAURA; TUSELL; SERRATOSA (2003). Os encéfalos de animais de 3 dias de vida foram removidos e as meninges foram dissecadas com o auxílio de lupa e o cerebelo descartado. O tecido cerebral foi incubado com tripsina (0,25%) por 10 minutos à 37°C, após este período a reação foi parada com 10% de soro fetal bovino (SFB) e então processada com pipetas de diferentes calibres para a digestão mecânica. Após a digestão, as células foram deixadas em repouso por 2 minutos e o sobrenadante coletado e passado por filtro de 70 µM. A suspensão foi então centrifugada à 450 x g por 5 minutos em temperatura ambiente. O pellet foi ressuspenso em DMEN-F12 contendo 10% de SFB, 1% de L-glutamina (200 mM), 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de piruvato e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram cultivadas em placas de diferentes diâmetros dependendo do experimento a ser realizado.

Nos dois tipos de culturas utilizadas nesse trabalho foi realizado o protocolo descrito acima, variando apenas no método de plaqueamento das células. Para a cultura enriquecida com neurônio, as placas foram previamente tratadas com Poli-L lisina por 3 horas em estufa 37°C e posteriormente acondicionadas com meio por 30 minutos. Após este período, as células foram plaqueadas e incubadas por 7 dias à 37°C com 5% CO₂. Para a cultura mista, as células foram plaqueadas sem a necessidade de tratamento prévio das placas, elas foram então incubadas à 37°C com 5% CO₂ por aproximadamente 17 a 21 dias até o aparecimento das células da microglia na camada superior.

3.5. Tratamento celular

Para o estabelecimento da concentração de LPS a ser utilizada no estudo, foi realizado um experimento de dose resposta, no qual as culturas foram estimuladas com 1 µg/mL ou 100 ng/mL de LPS. Após o desafio aguardou-se 24 horas para a coleta do sobrenadante e a produção de citocinas foi analisada pela técnica de CBA.

Após o experimento de dose resposta, foi estabelecido que as culturas seriam desafiadas com 100 ng/mL de LPS e, após 24 horas, seriam realizados os protocolos.

Para determinar se os efeitos observados eram provenientes da atividade da microglia, as células foram tratadas com aminociclina (10 μ M) 24 horas antes do estímulo com LPS.

3.6. Citometria de Fluxo

✓ Avaliação da expressão de moléculas de superfície

Após confluência das culturas, as células foram descoladas com tripsina (Gibico - 0,25%) por 20 minutos e posteriormente ressuspensas em meio DMEM Hans F12, seguido de centrifugação 450 x g a 4°C por 5 minutos o pellet celular foi então ressuspensado em 25 μ L de solução de bloqueio (Fc block na diluição 1:100) para impedir a ligação inespecífica dos anticorpos, sendo a incubação realizada por 20 minutos a 4°C. Logo após este processo, as células foram centrifugadas a 450 x g a 4°C por 5 minutos e ressuspensas com os anticorpos específicos conjugados com os fluorocromos (CD80 - PE, CD86 – PERCP e CD11b - APC) na diluição de 1:100. As células foram então incubadas pelo período de 20 minutos a 4°C, e posteriormente lavadas duas vezes com 200 μ L de PBS e ressuspensas em 200ul de PBS para leitura.

✓ Avaliação da expressão de marcadores intracelulares

As amostras foram ressuspensas em 50 μ L de Fixperm[®] e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente (TA) sendo em seguida adicionados 150 μ L de Permwash[®] e incubados no escuro por 5 minutos à TA, em seguida as amostras foram centrifugadas a 450g a 4°C por 5 minutos. Após este processo, as células foram então incubadas com o coquetel do anticorpo desejado (GFAP – FITC). As células foram posteriormente lavadas, centrifugadas a 450 x g a 4°C por 5 minutos e ressuspensas em 200 μ l de paraformoldeído 1%.

A aquisição e análise das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo FACS Accuri C6[®] (Becton & Dickinson, Mountain View, CA).

3.7. Avaliação de morte celular por Anexina e PI

Após a coleta do meio, foi acrescentado Tripsina (0,25%) nas células para que as mesmas descolem da placa. As células foram então colocadas em estufa à 37°C por 20 minutos, após este período a reação foi parada com 10% de soro fetal bovino (SFB) e as células coletadas e colocadas em tubos cônicos de 15 mL para centrifugação à 450 x g por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas e ressuspensas em tampão de ligação (10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ e 1,8 mM CaCl₂) contendo anexina V-FITC e PI na diluição 1:20 (em volume final de 20 µL). A incubação ocorreu por 20 minutos em temperatura ambiente, no escuro. Após esse período, foram acrescentados 80 µL do tampão de ligação e a amostra foi adquirida no citômetro de fluxo FACS Accuri C6® (Becton & Dickinson, Mountain View, CA).

3.8. Imunofluorescência

Após o período de confluência das células, o meio de cultura foi removido, e as células que estavam aderentes à placa, foram lavadas 3 vezes com PBS e posteriormente fixadas com metanol 100% por 20 minutos em temperatura ambiente, seguida de nova lavagem com PBS. A seguir, as células foram incubadas com uma solução de glicina 40 mM em PBS por 5 minutos, a qual se seguiu nova lavagem. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de bloqueio (Triton 0,05%, BSA 1% em PBS) durante 2 horas em temperatura ambiente. Após lavagens, as células foram então incubadas com anticorpo primário em diluição específica (marcação para microglia – lectina de tomate marcada com FITC (1:500); marcação para astrócito – anticorpo anti-GFAP (1:5000); marcação de neurônio – MAP2 (1:500)) *overnight* a 4°C em câmara escura. As células foram lavadas com PBS durante 5 minutos por 5 vezes e incubadas por duas horas em temperatura ambiente em câmara escura com anticorpo secundário específico (GFAP anti-mouse – alexa flúor 594 1:500; MAP2 anti-chicken – alexa flúor 555 (1:250)) diluídos em solução de bloqueio. Ao final da incubação, as células foram novamente lavadas por 5 vezes com PBS. Foram acrescentados 150 µL de DAPI (1:100.000) por 15 minutos para a visualização nuclear, seguida de 5 lavagens de 5 minutos.

3.9. Dosagem de citocinas

Para a quantificação das citocinas *in vivo* o tecido do SNC foi homogeneizado em tampão Tris HCl pH 7,4 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0,02% NaN₃, 1% Triton X, e inibidor de protease). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 17.000 x g por 30 minutos e a dosagem foi realizada no sobrenadante. Para as análises *in vitro* foram utilizados o sobrenadante das culturas para as dosagens.

A quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ , IL-10, MP2 e TNF- α , foi realizada pelo ensaio de *Citometry beads array* (CBA), seguindo instruções do fabricante - BD[®].

3.10. Dosagem de óxido nítrico

Para a realização desta técnica foram adicionados em igual proporção (1:1) o sobrenadante das culturas e o reagente de Griess (0,1% N-1 Naftil-etilenediamina; 1% sulfanilamida; 2,5% de H₃PO₄). As amostras foram então incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotometria (550 nm). As análises foram comparadas com curva de NaNO₂ (0 - 100 μ M) previamente estabelecida.

3.11. PCR

✓ Extração do RNA

Durante todo o protocolo foi utilizado material livre de RNase. A lise das células foi feita adicionando-se 1 mL de TRIzol[®] (Invitrogen), sendo as amostras mantidas por 5 minutos em temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio, seguido de agitação manual com espera de 2 a 3 minutos para garantir a separação das fases. Os microtubos foram centrifugados a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C para separação do RNA, DNA e proteínas. O RNA foi colocado em novo microtubo para a adição de 500 μ L de isopropanol e com posterior agitação em vórtex. Após repouso em temperatura ambiente de 45 minutos a 1 hora, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos em 12.000 x g a 4°C para a remoção do sobrenadante,

evitando contato com o precipitado de RNA. Após a adição de 1 mL de etanol 75% e centrifugação a 7.500 x g por 5 minutos à 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido à secagem em temperatura ambiente, por aproximadamente 5 minutos. Posteriormente, o RNA foi ressuscitado com 25 µL de água ultrapura (*RNAse/DNAse free*). A quantificação do RNA foi feita em NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

✓ Preparação do cDNA

Foi utilizada uma concentração de 1 µg/µL de RNA, diluído em 13 µL de solução *RNAse/DNAse free*, ao qual foram adicionados 1 µL de Oligo dT e 1 µL de dNTPmix, e misturados utilizando a pipeta. Esta mistura foi levada ao termociclador por 5 minutos à 65°C, sendo a reação seguida por incubação no gelo por 1 minuto. O próximo passo consistiu na adição de 4 µL de 5 x *first-strand Buffer*, 1 µL de DTT 0,1M e 1 µL de Super Script III RT 200 U/µL. A mistura foi novamente homogeneizada com pipeta, e levada ao termociclador por 60 minutos à 50°C no primeiro ciclo, 15 minutos a 70°C no segundo ciclo e posteriormente 5 minutos a 4°C. O cDNA foi armazenado à -20°C até o momento das análises.

✓ PCR em tempo Real

O cDNA preparado foi diluído em uma proporção de 1:5, sendo então utilizados 5 µL da solução para cada análise. O procedimento consistiu na preparação de um meio reacional contendo 1 µL de 20x Taqman Gene Expression Assay, 10 µL de 2x Taqman Gene Expression Assay Master Mix e 4 µL de água ultrapura (*RNAse/DNAse free*), este meio foi pipetado nos tubos Strip®, e em seguida foi adicionada a solução de cDNA. A partir deste momento a reação foi levada ao aparelho de Real Time da *Applied Biosystems*, onde foi realizada a leitura do PCR.

Para as análises de PCR Array, a extração de RNA e a preparação de cDNA seguiram o método descrito, porém para a reação de PCR foram utilizadas placas de *TaqMan™ Array Mouse Immune Response*. Estas placas vêm previamente acondicionadas com os diferentes *primers* por poço (Anexo 10.4), desta forma foram acrescentados 10 µL de cDNA e 10 µL de Master Mix por poço para uma concentração final de 50ng de cDNA, e a reação foi incubada no aparelho de *Real Time* da *Applied Biosystems*.

Para as análises de PCR Real Time foram utilizados *primers TaqMan™* para os genes IL-6, IL-10, TGF- β , iNOS, TLR4 e Chuk (IKK).

3.12. Quantificação de miRNA

Está técnica foi realizada em colaboração com o laboratório de biologia molecular do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP) sob coordenação da Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva com auxílio da aluna de doutorado Tanyara Baliani Payolla, na qual a técnica já se encontra padronizada.

O RNA foi extraído conforme descrito no item 5.11, e a síntese de cDNA foi realizada a partir de 130 ng de RNA total através de uma reação de poliadenilação, seguida pela reação de transcrição reversa. Resumidamente foram adicionados 2 μ L de RNA a um mix de poliadenilação contendo 1 μ L de buffer, 1 μ L de ATP, 0,5 μ L de poliadenilase (5000 U/mL – New England Biolabs #M0276L) e 5,5 μ L de água ultrapura (*RNAse/DNAse free*). As amostras foram então levadas ao termociclador por 10 minutos à 37°C. Após este período foram adicionados 0,5 μ L de adaptador (primer universal) e a reação voltou ao termociclador, sendo o primeiro ciclo à 60°C por 5 minutos e o segundo a 25°C por 2 minutos. Para a reação de transcriptase reversa foram adicionados 9,5 μ L do mix de High Capacity contendo 2 μ L de buffer, 0,8 μ L de dNTP, 2 μ L de primer, 1 μ L de enzima e 3,7 μ L de água ultrapura (*RNAse/DNAse free*) no RNA poliadenilado e a mistura então voltou ao termociclador para o primeiro ciclo de 25°C por 10 minutos seguido de 120 minutos à 37°C, posteriormente à 85°C por 5 minutos finalizando com 4°C.

A expressão gênica foi quantificada por PCR em tempo real utilizando o equipamento Stratagene Mx3005P da Agilent Technologies (Santa Clara, Califórnia, USA), SYBR Green como marcador fluorescente (Luna® Universal qPCR Master Mix #M3003L) e *primer* universal como anti-sense (os primers específicos de cada miRNA foram utilizados como *sense*). Para a reação foram adicionados 0,5 μ L de cDNA, 10 μ L de master mix, 0,5 μ L de primer universal, 0,5 μ L de primer específico para o miRNA e 8,5 μ L de água ultrapura (*RNAse/DNAse free*). Os miRNAs foram quantificados usando o método de comparação do Ct (*Cycle threshold*). Foram avaliados os miRNAs miR-146a, miR-155 e miR-223, sendo esses miRNAs escolhidos

através de levantamento bibliográfico. A normalização dos resultados de expressão foi feita utilizando-se o gene constitutivo RNU43.

3.13. Metilação global (5mC)

Está técnica foi realizada em colaboração com o laboratório da Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro (FCF USP), na qual as técnicas já se encontram padronizadas (OLIVEIRA et al., 2017). Para extração do DNA foi utilizado o Kit QUIAGEN®.

3.13.1. Extração de DNA tecidual

O tecido foi homogeneizado com solução de lise (Kit QUIAGEN®) acrescidos de DFO (0,5mM). Após a homogeneização foram acrescentados 7,5 µL de proteinase K (20 mg/mL) e a solução foi incubada 1 hora à 37°C. Após este período foram acrescentados 5 µL de RNase (15 mg/mL) e reincubadas por 1 hora a 37°C. A seguir, foram acrescentados 250 µL de solução de precipitação (Kit QUIAGEN®), agitação no vórtex, seguida de centrifugação a 2000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e o DNA foi precipitado em isopropanol 100% gelado, e então centrifugado a 1000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet de DNA lavado 2 vezes com solução de etanol 70% gelada. O etanol foi descartado e o pellet ressuspendido em solução de DFO (100mM). O DNA foi então quantificado em *Nanodrop*.

3.13.2. Extração de DNA das células

Após a retirada do meio, as células foram lavadas 3 vezes com PBS a 37°C, com posterior adição de 1,5 mL de solução de lise (Kit QUIAGEN®) por poço. Após homogeneização, as células foram coletadas em tubo cônico de 15 mL. Foram então adicionados 5 µL de RNase (15 mg/mL) e incubadas por 1h a 37°C. A seguir, foram acrescentados 500 µL de solução de precipitação (Kit QUIAGEN®), foi feita agitação em vórtex e centrifugação a 3.200 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e o DNA foi precipitado com 2,5 mL de isopropanol 100% gelado, e então centrifugado a 3.200 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o

pellet de DNA foi lavado 2 vezes com solução de etanol 70% gelada. O etanol foi descartado e o pellet ressuspendido em solução de DFO (100 mM). O DNA foi então quantificado em *Nanodrop*.

3.13.3. Hidrólise e Quantificação do DNA

O protocolo descrito a seguir foi realizado para todo o DNA extraído, independente de qual fonte primária.

Alíquotas contendo 10 µg de DNA foram enzimaticamente hidrolisadas pela adição de 1,5 µL de tampão Tris-HCl / MgCl₂ 200 mM (pH 7,4) e 1 µL (0,25 unidades) de desoxirribonuclease I do pâncreas bovino (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). As amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora e 1 µL (0,0016 unidades) de fosfodiesterase I de *Crotalus atrox* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 1 µL (2 unidades) de fosfatase alcalina de mucosa de intestino bovino (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Após incubação por 1 hora a 37°C, as amostras foram centrifugadas a 9.300 x g por 10 minutos, e alíquotas de 60 µL do sobrenadante foram injetadas em um sistema HPLC-DAD para quantificação de 2'-desoxicitidina (dC). A separação cromatográfica foi feita por meio de uma coluna Luna C18 (2) de 250 x 4,6 mm id, 5,0 µm (Phenomenex, Torrance, CA, EUA), eluída com um gradiente de água (solução A) e 50% de metanol (solução B), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico, a um fluxo de 1 mL/minuto e temperatura de 35°C como se segue: 0-26,5 minutos: 0-40% B; 26,5 a 32 minutos: 40 a 75% de B; 32 a 33 minutos: 75% de B; e 33 a 34 minutos: 75 a 0% de B

3.14. Encefalomielite autoimune experimental (EAE)

A prole das fêmeas expostas a fumaça do cigarro ou não, foram mantidas no biotério até atingirem 8 semanas, onde o protocolo foi iniciado. Os camundongos receberam injeção subcutânea de 150 µg de MOG₃₅₋₅₅ (mielina de oligodendrócito de sequência *MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK*, sintetizado por Proteimax Biotecnologia - São Paulo - SP - Brasil) e emulsificado em CFA (do inglês *Complete Freund Adjuvant*) (v/v), contendo 500 µg de M. Tuberculosis Des, H37 Ra (Becton & Dickinson -BD). Após a imunização com MOG₃₅₋₅₅, por via subcutânea na base da cauda os

camundongos receberam duas doses de 200 ng da toxina *Bordetella pertussis* por via intraperitoneal, nos períodos de 0 e 48 h após a imunização. Todos os animais foram acompanhados diariamente pelo período máximo de 40 dias e o grau de doença foi dado de acordo com a escala a seguir: 0 - nenhuma doença, 1 - cauda flácida, 2 - dificuldade de locomoção, 2,5 - patas traseiras parcialmente paralisadas, 3 - patas traseiras completamente paralisadas, 4 - paralisia completa das patas traseiras junto a paralisia parcial das patas dianteiras, 5 - paralisia completa ou morte.

3.15. Histologia

Esta análise foi realizada em colaboração com o laboratório de vacinas e imunomodulação - IBB, UNESP, Botucatu. Sob coordenação da Profa. Dra. Alexandrina Sartori e aluna Luiza Ayumi Nishiyama Mimura.

Para as análises de histologia foram utilizados o terço distal das medulas dos animais submetidos ao protocolo de EAE, expostos ou não à fumaça do cigarro durante o período gestacional, tanto no pico da doença quanto após 40 dias.

A avaliação histopatológica foi realizada por análise do infiltrado inflamatório pela coloração com Hematoxilina & Eosina e a desmielinização pela coloração com Luxol Fast Blue em amostras fixadas em formalina tamponada (10%). A análise semi-quantitativa das amostras foi realizada de acordo com o seguinte escore de infiltrado celular (adaptado de SOELLNER et al., 2013): (0) sem infiltrado, (1) infiltrado meningeal parcial, (2) infiltrado meningeal disperso e (3) infiltrado meningeal pronunciado e parenquimal parcial.

3.16. Análise Estatística

Os resultados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste *post hoc* de *Tuckey*. As diferenças foram consideradas significantes para o valor $p \leq 0,05$. Os valores foram expressos como “*média ± erro padrão da média*”.

Para as análises da variação de peso dos neonatos, consumo de água e de ração, ensaio de padronização do tempo de eutanásia “*in vivo*”, bem como a metilação global foi utilizado o teste *t-Student*. Para a análise da variação do peso das fêmeas

prenhes foi realizada análise de variância com medidas repetidas (*Two way ANOVA*) e teste post hoc de *Tukey*.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Padronizações

4.1.1. Parâmetros Biológicos e de exposição

Com o intuito de avaliar a absorção da fumaça do cigarro em nosso modelo realizamos a análise das concentrações de COHb, cotinina, 3-hidroxicotinina, bem como a razão de 3-hidroxicotinina e cotinina (Tabela 4), para os animais expostos à fumaça do cigarro durante todo o período gestacional. A Tabela também apresenta a concentração de CO no ar ambiente.

Na Figura 11A observamos que a exposição à fumaça do cigarro não influencia o ganho de peso das fêmeas durante a gestação, confirmado pela ausência de interação ($F(11, 231) = 1,166$; $p = 0.3115$) entre os parâmetros “dias gestacionais” e “grupo” para a variação de peso, porém observamos um efeito de tempo ($F(11, 231) = 94,77$; $p < 0.0001$), na qual verifica-se aumento significativo do peso das fêmeas entre o primeiro e o último dia gestacional.

Em relação ao consumo de água (Figura 11B), não houve diferença ($p = 0.8975$) entre os grupos estudados, porém no consumo de ração (Figura 11D) os animais expostos à fumaça do cigarro apresentaram uma menor ingestão alimentar quando comparados com os animais controles ($p > 0.0001$). Na avaliação do peso dos neonatos observamos uma diminuição significativa ($p = 0.0193$) no peso da prole de fêmeas expostas à fumaça do cigarro em relação a prole de fêmeas não expostas (Figura 11 C).

Tabela 4: Parâmetros biológicos e de exposição. Concentração de COHb em sangue total e de cotinina e 3-hidroxicotinina no plasma dos animais expostos à fumaça do cigarro (3R4F) por 20 dias (n=10); dosagem de monóxido de carbono (CO) no ar ambiente. Os dados são expressos em média ± dpm,

Parâmetros Biológicos e de Exposição					
	CO (PPM)	COHb (%)	Cotina (ng/mL)	3-Hidroxicotina (ng/mL)	Razão 3HC/Cotina
Controle	Não Detectado	0,89 ± 0,45	Não Detectado	Não Detectado	-
Exposto	480,10 ± 191,00	10,14 ± 4,60	32,9 ± 2,58	28,4 ± 2,49	0,86 ± 0,96

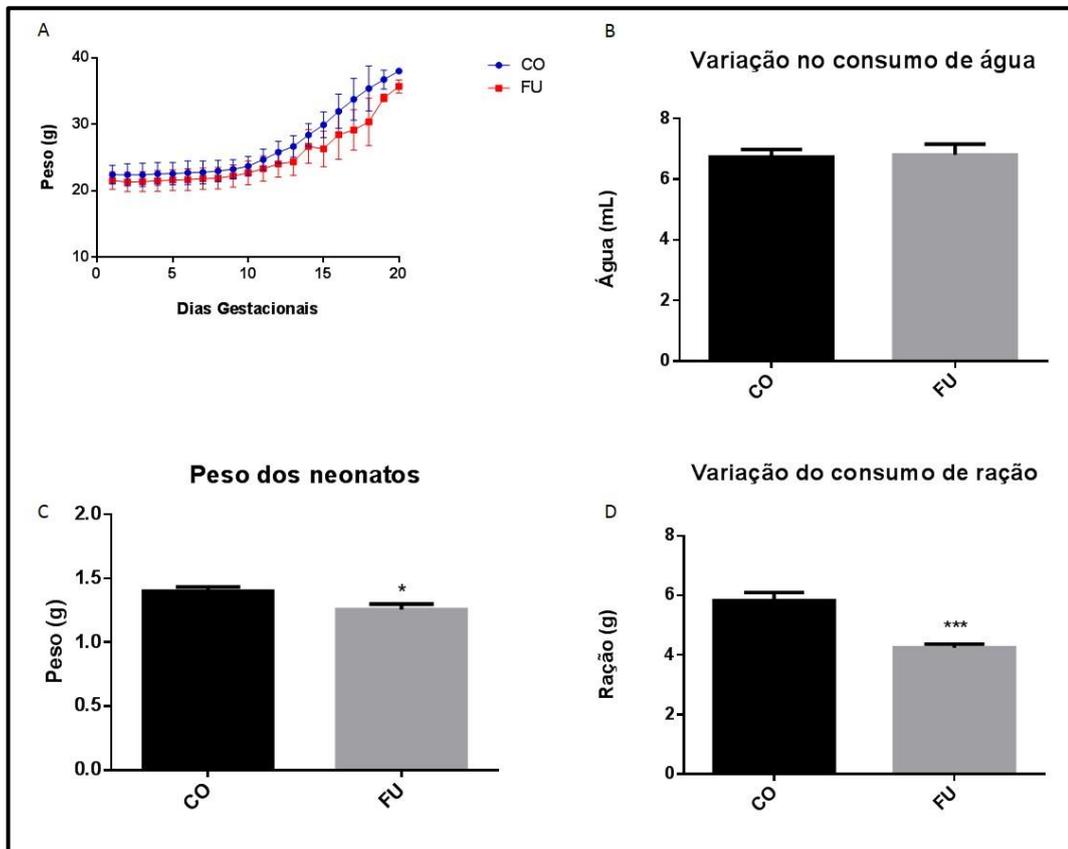


Figura 11: Avaliação dos parâmetros biológicos das fêmeas prenhes e dos neonatos. A) Variação do peso das fêmeas do dia 0 (plug vaginal) até o 20º dia gestacional (n=12); B) Variação do consumo de água durante todo o período gestacional por animal por dia (n=6); C) Peso dos neonatos no dia da eutanásia (3º dia de vida pós-natal). D) Variação do consumo de ração durante todo o período gestacional por animal por dia (n=6); CO – Grupo controle exposto ao ar sintético; FU – Grupo fumante exposto à fumaça do cigarro. Análise estatística: Teste t-Student para B, C e D. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. & - diferença estatisticamente significativa em Teste t-Student e Anova de duas vias com medidas repetidas para A.

4.1.2. Cultura mista de glia

A Figura 12 apresenta a cultura mista de glia após 17 dias de maturação. Pode-se observar as células da microglia (seta vermelha) na camada superior e os astrócitos (seta amarela) na camada inferior da cultura indicando que a cultura está pronta para realização dos experimentos (BRONSTEIN et al., 2013).

Para confirmação dos tipos celulares realizamos a marcação destas células por imunofluorescência (Figura 13). A letra A corresponde a marcação de lectina de tomate (verde – microglia), a letra B corresponde a marcação de GFAP (vermelho – astrócito) nas letras C e D podemos observar a sobreposição de ambas marcações com DAPI para demarcação nuclear.

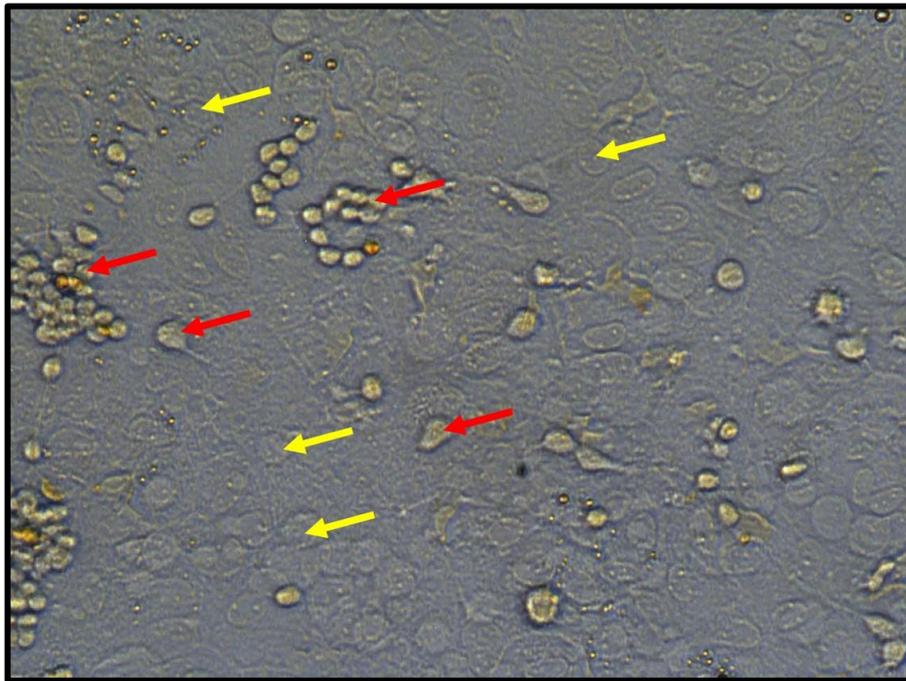


Figura 12: Foto de campo claro da cultura mista de glia. As setas vermelhas representam as células da microglia e as setas amarelas representam os astrócitos.

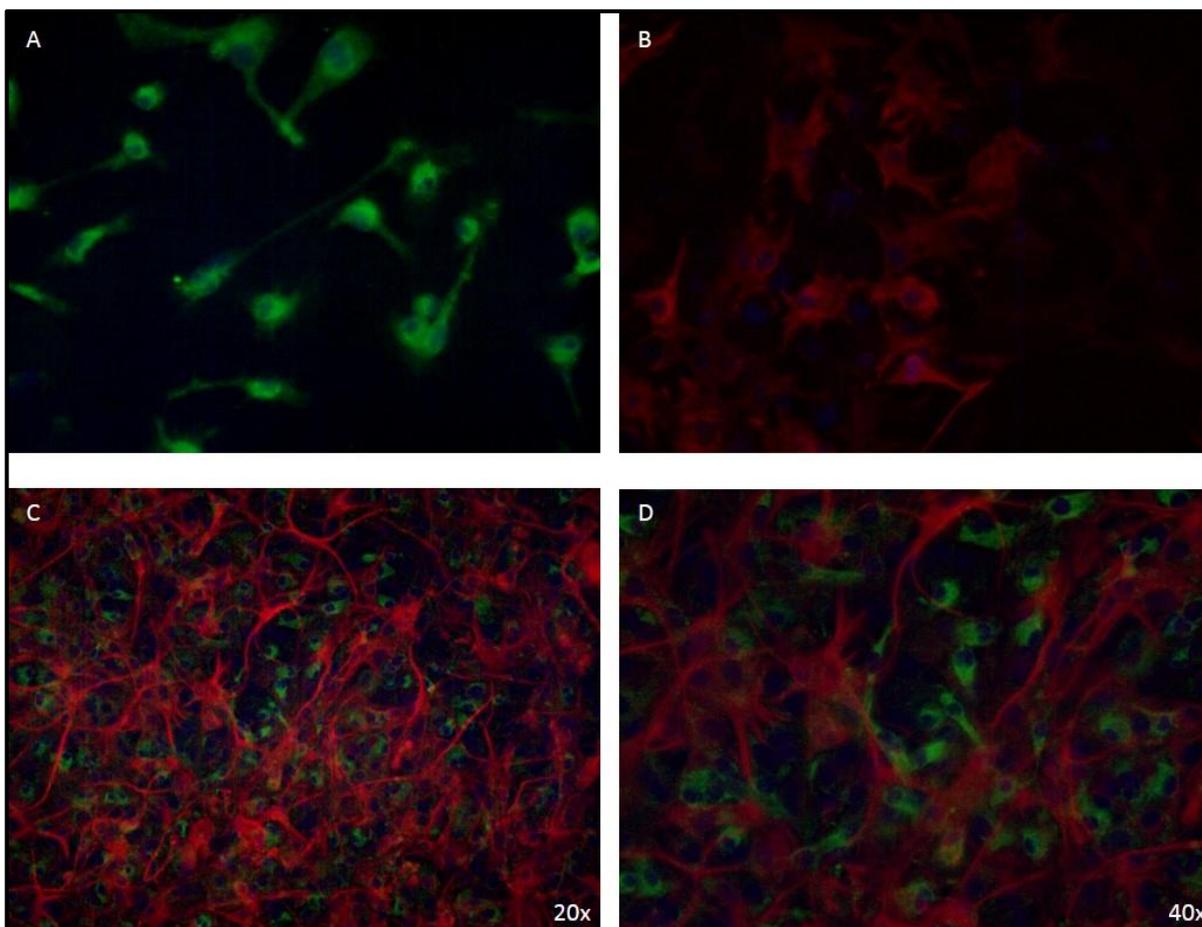


Figura 13: Imunofluorescência da cultura mista de glia. A) marcação de microglia (lectina de tomate); B) Marcação de astrócito (GFAP); C e D) sobreposição de diferentes regiões.

4.1.3. Cultura enriquecida neurônio

A Figura 14 apresenta a cultura enriquecida de neurônio. Podemos observar a maturação e o desenvolvimento celular com o passar dos dias após a realização da cultura. O Dia 1 corresponde ao primeiro dia após a realização da cultura, na qual observamos as células em formato ovalada e não diferenciado. Com o passar dos dias é possível verificar a diferenciação celular até a maturação da cultura no 7^o dia após o plaqueamento, sendo este o momento em que os experimentos foram realizados. Para caracterização da cultura foi realizada uma imunofluorescência para os marcadores GFAP (astrócito - vermelho), Lectina de tomate (microglia - verde), MAP2 (neurônio - verde) e DAPI (núcleo – azul). Na Figura 15A e B observamos a marcação de MAP2 e DAPI e na Figura 15C e D podemos observar as marcações de GFAP, Lectina e DAPI.

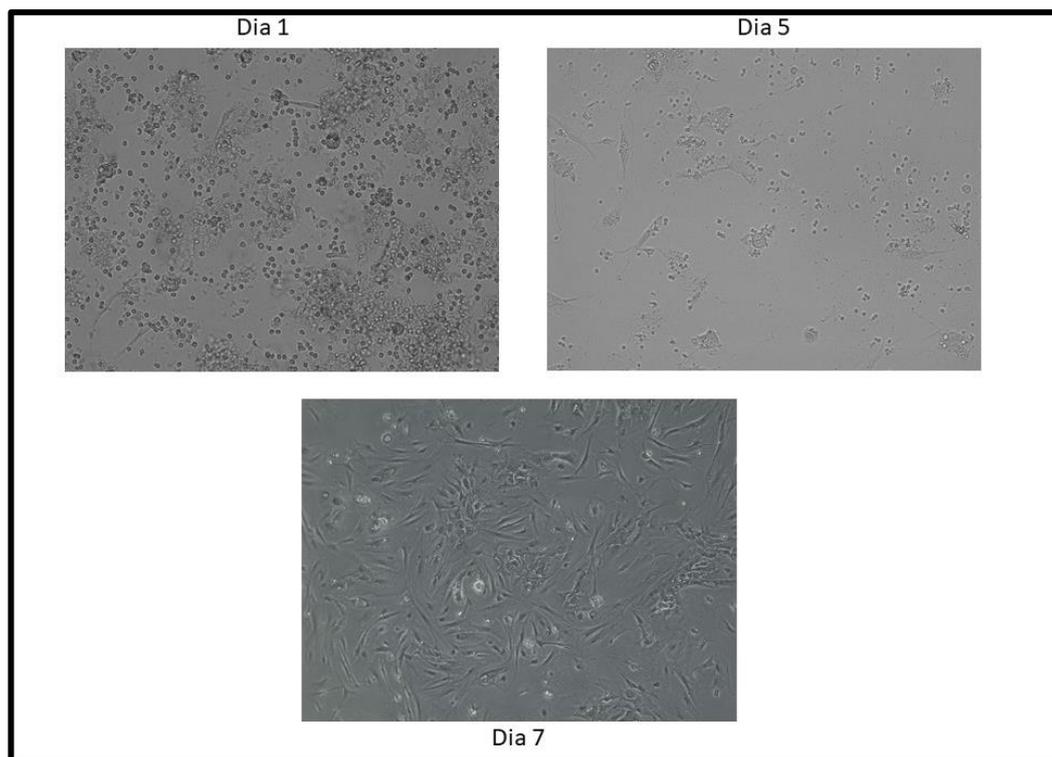


Figura 14: Foto campo claro da cultura enriquecida com neurônio. Dia 1 representa o primeiro dia pós plaqueamento; Dia 5 representa o início da diferenciação celular e Dia 7 representa a cultura madura.

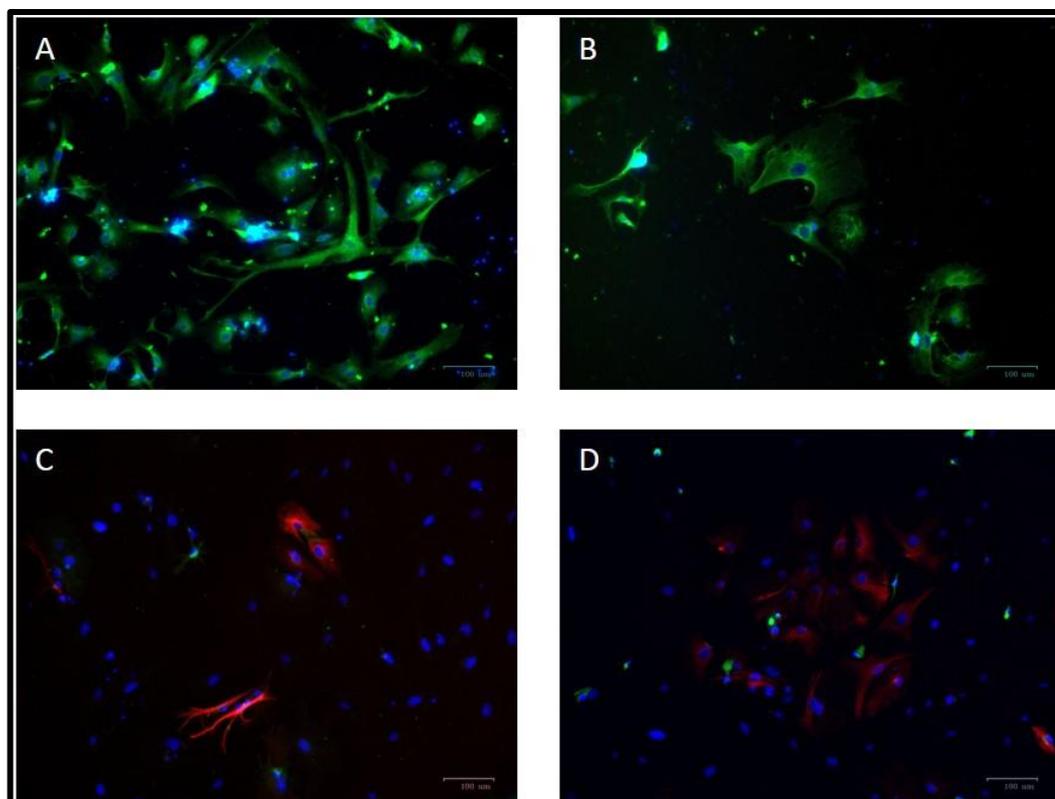


Figura 15: Imunofluorescência da cultura enriquecida de neurônio. As letras A e B) mostram a marcação para MAP2 (neurônio) e DAPI (núcleo); as letras C e D) as marcações para DAPI (núcleo), GFAP (astrócito – vermelho) e Lectina de tomate (microglia – verde).

4.1.4. Cinética de Produção de Citocinas

Para determinar qual o melhor tempo para avaliação das citocinas produzidas no SNC foi realizado uma curva tempo-resposta para as citocinas IL-6, IL-1 β , IFN γ , IL-10, IL-12 e TNF α quantificadas em homogenato de SNC dos neonatos provenientes da prole de animais controle desafiados com LPS 1 mg/Kg ou salina i.p., e eutanasiados nos períodos de 1h, 4h, 8h, 12h e 24h após o desafio (Figura 16).

Podemos observar uma diferença estatisticamente significativa para as citocinas TNF α nos períodos de 1h ($p < 0.001$) e 4h ($p < 0.05$) (Figura 16F); IL-6 nos períodos de 4h ($p < 0.01$) e 8h ($p < 0.01$) (Figura 16A); IL-10 no período de 12h ($p < 0.05$) (Figura 16C) e IFN γ nos períodos de 8h ($p < 0.05$) e 12h ($p < 0.01$) (Figura 16B). Não foram observadas alterações nas citocinas IL-10, IL-12 e IL-1 β . Com o intuito de analisar o pico da resposta inflamatória, o período de resposta escolhido foi o de 4h, uma vez que é possível verificar maiores concentrações de citocinas no SNC dos neonatos.

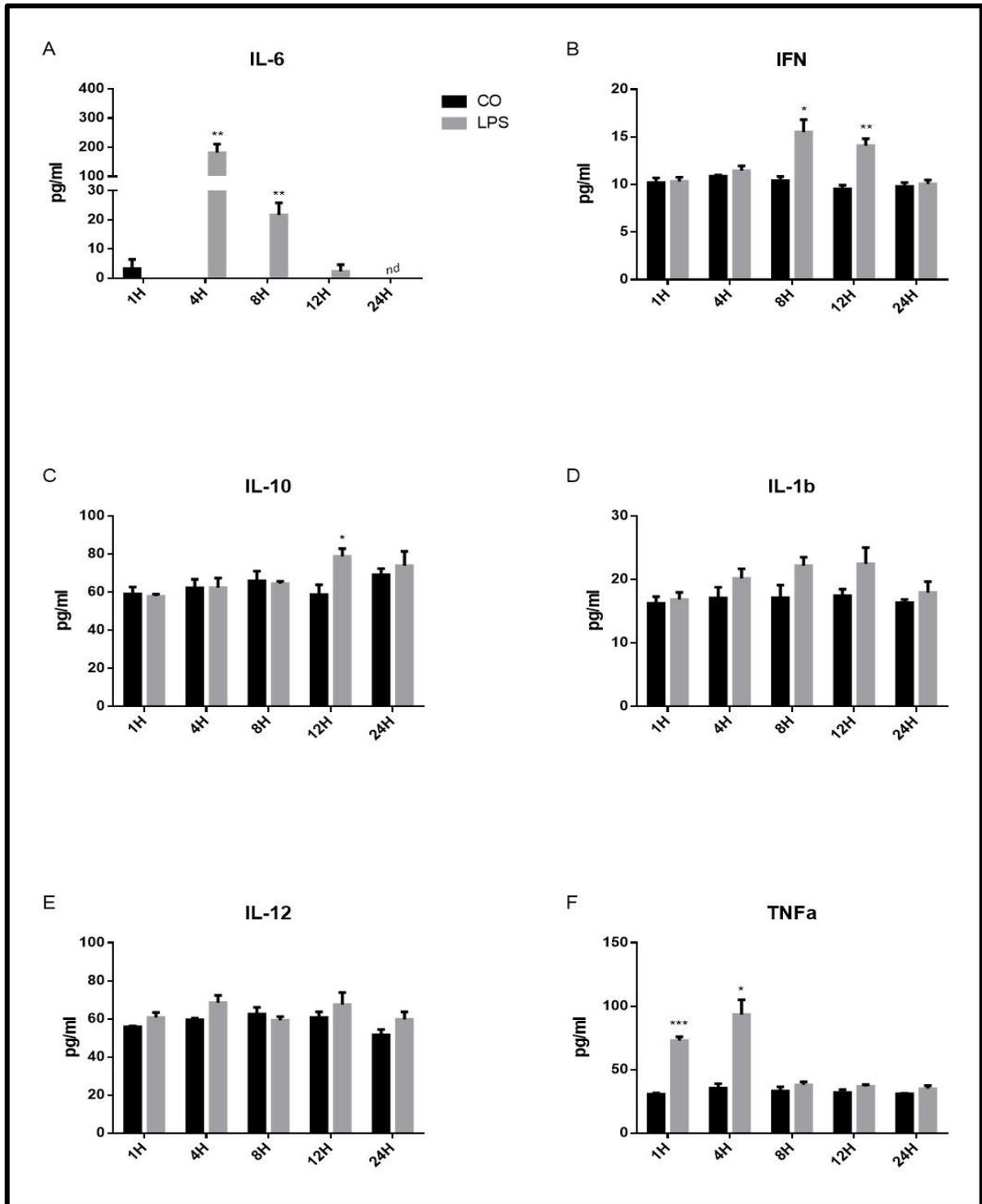


Figura 16: Dosagem das citocinas em homogenato total de SNC. Neonatos provenientes da prole de animais controle, desafiados com LPS (1 mg/Kg) ou salina i.p. e eutanasiados nos períodos de 1h, 4h, 8h, 12h e 24h após o desafio. IL-6 (A), IL-1 β (D), IFN γ (B), IL-10 (C), IL-12 (E) e TNF α (F) CO – controle, LPS – grupo desafiado com LPS (n=3; Análise estatística: Teste *t-Student* * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$,

4.1.5. Padronização da concentração de lipopolissacarídeo a ser utilizada na cultura

Com o intuito de verificar qual concentração de LPS deveria ser utilizada nos protocolos *in vitro*, foram avaliadas as doses de 1 µg/mL e de 100 ng/ml de LPS no período de 24 horas, conforme apresentado na Figura 17. Podemos observar que ambas as concentrações de LPS tiveram efeito, uma vez que as citocinas pró e anti-inflamatórias apresentaram um aumento significativo em relação ao controle. Para as citocinas IL-10 (B) e IL-1β (C) a concentração de 1 µg/ml de LPS gerou maiores concentrações destas citocinas quando comparada a 100 ng/ml ($p < 0.05$ para ambas). Assim, foi escolhida a concentração de 100 ng/ml uma vez que esta já ativa a resposta das células da glia, mas com menores chances de induzir morte celular (BRANDÃO, 2017).

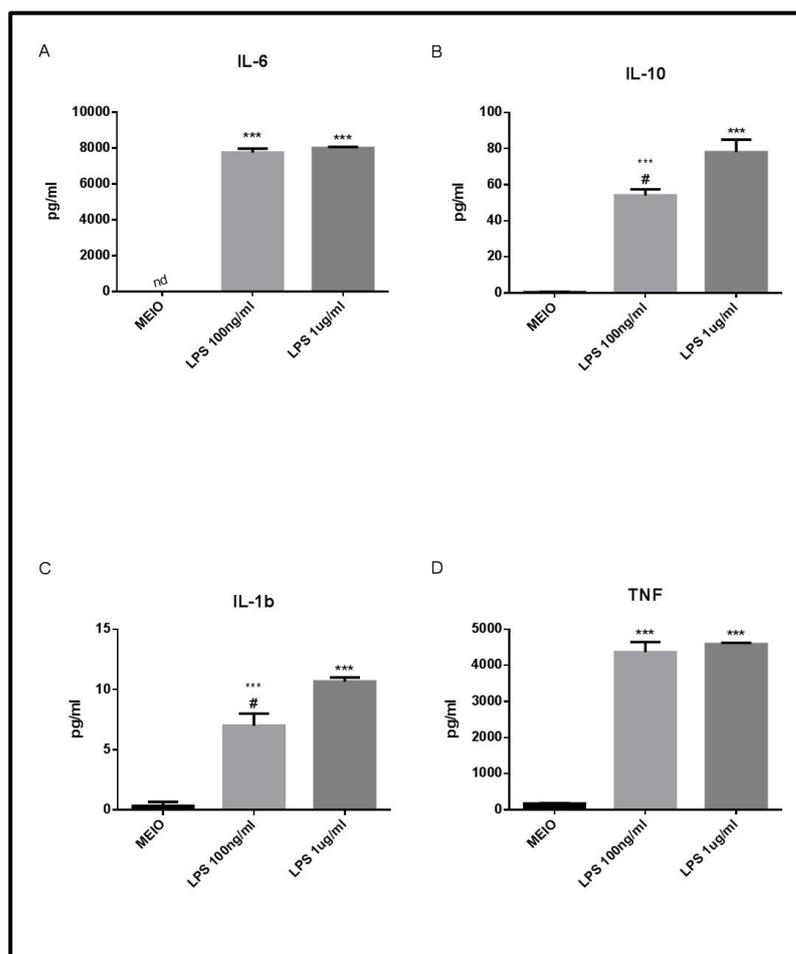


Figura 17: Dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura mista de glia. Cultura desafiada com LPS nas concentrações de 100 ng/ml e 1 µg/ml (n=3). ANOVA post hoc Tuckey. * em relação ao meio # em relação ao LPS 1 µg/ml. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4.2. Resposta Neuroinflamatória “in vivo”

4.2.1. Perfil transcricional do SNC de Neonatos

Com o intuito de verificar se a exposição à fumaça do cigarro altera a resposta neuroinflamatória da prole de mães expostas durante todo o período gestacional, foi realizado um *screening* de 94 genes pró e anti-inflamatórias do homogenato de encéfalo total.

Na Figura 18 os gráficos em "Scatter plot" fazem a comparação da expressão gênica, ou seja, todos os genes com aumento ou diminuição em relação ao grupo de comparação em pelo menos 2 vezes da expressão do controle são apresentados fora das linhas centrais do gráfico. Em vermelho temos o aumento da transcrição e em verde a diminuição.

Podemos observar que no grupo exposto à fumaça do cigarro durante a gestação e desafiado com salina há um aumento da transcrição gênica de CCL5 (*fold regulation* = 2,11) e uma diminuição da transcrição das proteínas CCR2 (*fold regulation* = -3,37), SOCS1 (*fold regulation* = -2,53) e Nfatc4 (*fold regulation* = -2,09) quando comparado com a prole controle (FIGURA 18A).

Já no grupo apenas desafiados com LPS há o aumento da transcrição de genes pró-inflamatórios como as citocinas TNF α (*fold regulation* = 23,74), IL-6 (*fold regulation* = 3,47), IL-1 β (*fold regulation* = 14,57), e as quimiocinas CCL5 (*fold regulation* = 30,97) e CCL2 (*fold regulation* = 44,67) quando comparado com o grupo sem nenhum estímulo, demonstrando a capacidade inflamatória do LPS no sistema nervoso central. Também é possível observar uma diminuição da transcrição do gene CCR2 (*fold regulation* = -3,20) em comparação com o controle. Quando comparados os grupos LPS e FPS observamos apenas uma diminuição de CCR2 (*fold regulation* = -2,48).

No Anexo 8.5 é possível verificar a tabela descritiva dos resultados apresentados bem como os gráficos de análise individual de cada gene. Os dados estão apresentados em *Fold Change* ou Δ CT quando não há detecção da expressão do gene no grupo controle.

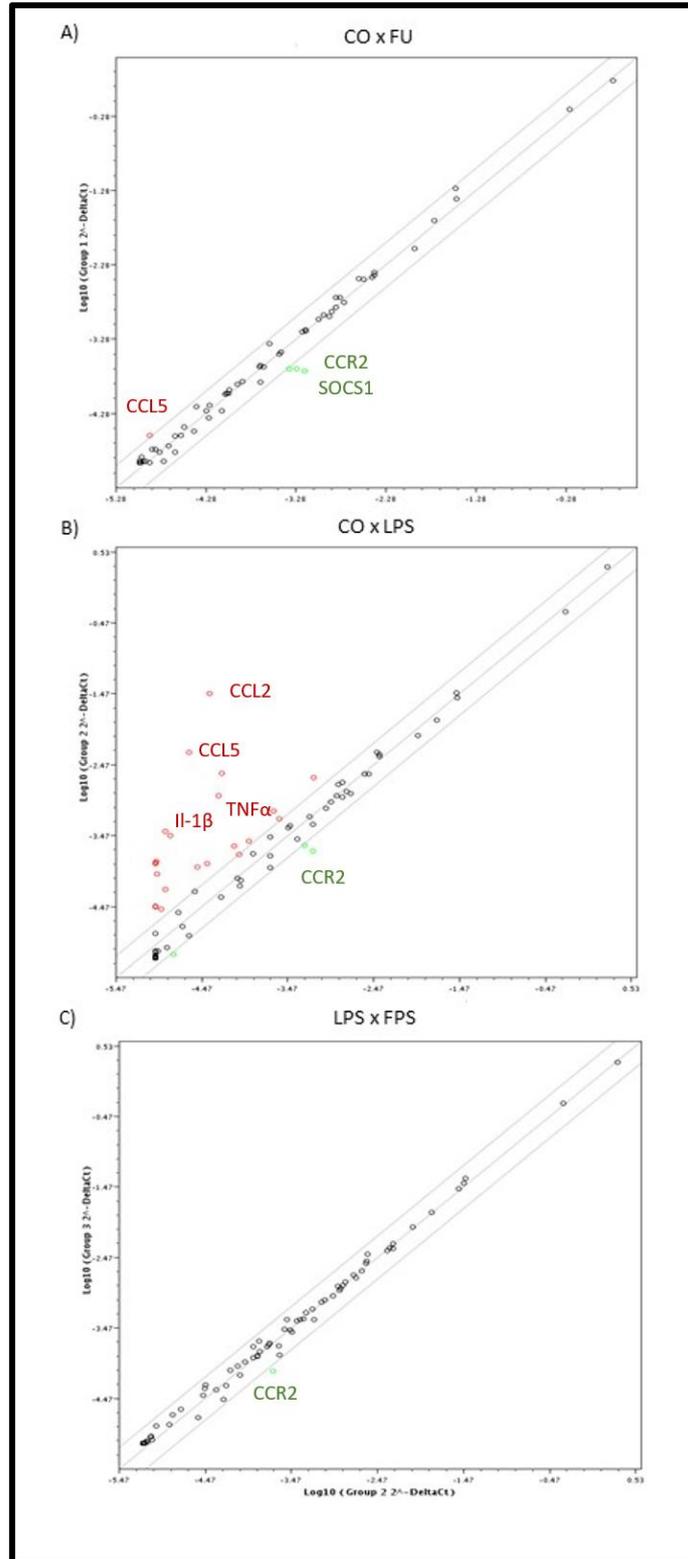


Figura 18: Gráfico representativo de PCR Array. Análise realizada em homogenato de encéfalo total de prole de camundongos fêmeas expostas à fumaça do cigarro e desafiada com salina (FU) ou LPS (FPS) no 3º dia de vida e da prole de camundongos fêmeas expostas ao ar sintético e desafiada com salina (CO) ou LPS (LPS) no 3º dia de vida. A) Comparação entre os grupos CO e FU; B) Comparação entre os grupos CO e LPS; C) Comparação entre os grupos LPS e FPS. Pontos vermelhos representam genes com transcrição aumentada pelo menos 2x em relação ao grupo analisado. Pontos verdes representam genes com transcrição diminuída pelo menos 2x em relação ao grupo analisado.

4.3. Alteração da resposta inflamatória em cultura de células da microglia e astrócitos

Após verificar que a exposição à fumaça do cigarro durante a gestação pode alterar a expressão de genes inflamatórios na prole, nosso próximo passo foi entender quais as alterações celulares estavam ocorrendo.

4.3.1. Ativação celular por citometria de fluxo

Na Figura 19A observamos que há um aumento significativo do número de astrócitos no grupo exposto à fumaça do cigarro (FU) ($p < 0.05$) e no grupo exposto à fumaça do cigarro e desafiado com LPS (FPS) ($p < 0.0001$) em relação ao controle (CO) e ao grupo LPS (LPS) ($p < 0.01$ e $p < 0.0001$ respectivamente). A porcentagem de astrócitos (FIGURA 19C) encontra-se aumentada no grupo FPS em relação ao grupo CO ($p < 0.01$) e FU ($p < 0.01$). Esta diferença deve ser relativa às variações encontradas na porcentagem de células da microglia, uma vez que ambas foram avaliadas no mesmo "gate" de análise (Figura 19H). Em relação à quantificação do MFI (média de intensidade de fluorescência) do marcador GFAP, observamos uma diminuição estatisticamente significativa para o grupo FPS em relação ao controle ($p < 0.01$) (FIGURA 19E).

Podemos observar que as células da microglia se encontram em maior número absoluto no grupo FU ($p < 0.05$ e $p < 0.01$ em relação ao LPS), porém quando analisada em porcentagem há uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao grupo CO e FU dos grupos desafiados com LPS ($p < 0.0001$ e $p < 0.0001$ respectivamente). Conforme exposto anteriormente, este fato pode ser devido ao crescimento em maior escala dos astrócitos em relação às microglias, culminando nesta diferença das frequências celulares. No contexto de ativação das células da microglia, verifica-se aumento de CD80 (B7.1) para os grupos desafiados com LPS (LPS $p < 0.0001$ e FPS $p < 0.0001$) em relação aos grupos FU e LPS.

Para a molécula CD86 (B7.2) observamos aumento nos grupos LPS e FPS em relação ao controle ($p < 0.0001$ e $p < 0.0001$ respectivamente) e ao grupo FU ($p < 0.001$ e $p < 0.0001$ respectivamente). Vale destacar que no grupo FU há aumento estatisticamente significativo de CD86 em relação ao controle (Figura 19F e G).

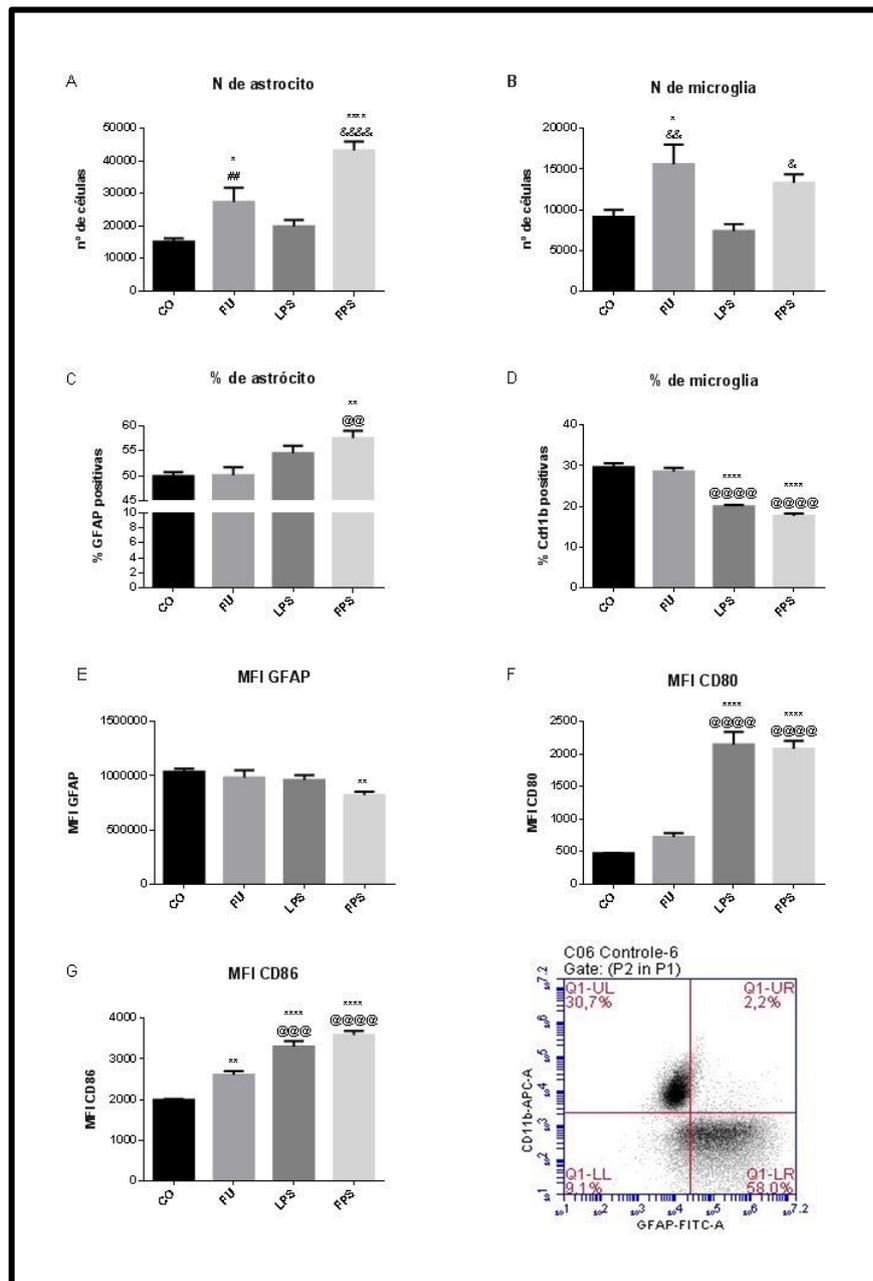


Figura 19: Citometria de Fluxo em cultura mista de glia. Marcação de astrócito (GFAP) e microglia (CD11b) A) n° total de células astrocíticas; B) n° total de células da micrógliia; C) % de astrócitos; D) % de micrógliia; E) Média de Intensidade de Fluorescencia (MFI); F) MFI para CD80; G) MFI para CD86. Cultura mista de glia proveniente do encéfalo total da prole no 3º dia de vida de camundongos fêmeas expostas ou não à fumaça do cigarro durante toda a gestação. Após realização da cultura, esta foi desafiada com LPS formando os grupos CO – exposto ao ar sintético e desafiado com meio; FU- exposto à fumaça do cigarro e desafiado com meio; LPS – exposto ao ar sintético e desafiado com LPS; FPS – exposto à fumaça do cigarro e desafiado com LPS (n=6. Análise estatística: One way Anova e post hoc Tuckey) “***” em relação ao CO; “@” em relação ao FU; “&” em relação ao LPS

4.3.2. Perfil transcricional da cultura de glia

Na Figura 20 podemos observar que no grupo exposto à fumaça do cigarro e desafiado com LPS há aumento da transcrição dos genes IL-6 ($p < 0.0001$) e iNOS ($p < 0.0001$) em relação aos outros grupos experimentais e aumento da transcrição de TLR4, IKK (Chuk) e IL-10 em relação ao grupo CO ($p < 0.001$; $p < 0.05$; $p < 0.01$) e FU ($p < 0.01$; $p < 0.05$; $p < 0.01$). Em relação ao grupo exposto ao ar sintético e desafiado com LPS, verificamos aumento da transcrição de TLR4, IL-10 em relação ao grupo controle.

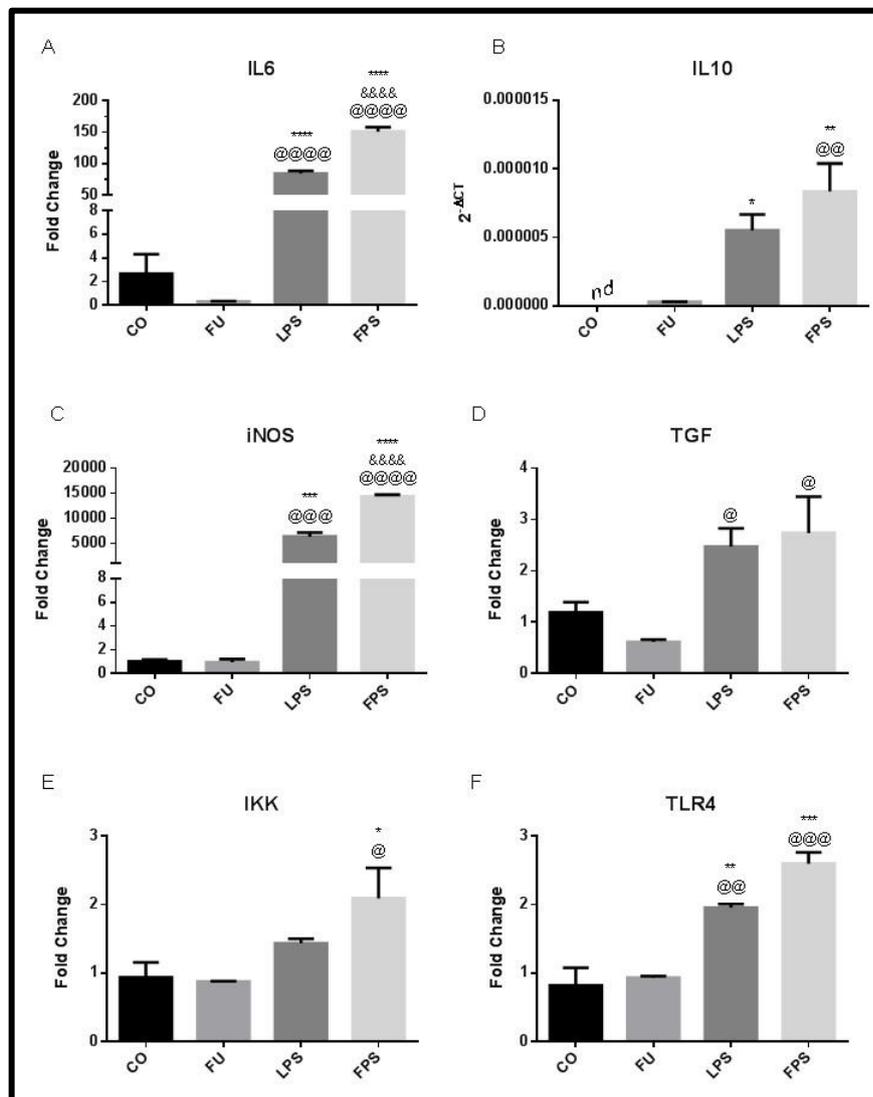


Figura 20: PCR de cultura mista de glia. Cultura mista de glia da prole de camundongos fêmeas expostas ou não à fumaça do cigarro. Após realização da cultura, esta foi desafiada com LPS formando os grupos CO – exposto ao ar sintético e desafiado com meio; FU- exposto à fumaça do cigarro e desafiado com meio; LPS – exposto ao ar sintético e desafiado com LPS; FPS – exposto à fumaça do cigarro e desafiado com LPS (n=6. Análise estatística: One way Anova e post hoc Tuckey) “*” em relação ao CO; “@” em relação ao FU; “&” em relação ao LPS

4.3.3. Dosagem de citocinas

Para a avaliação do perfil de citocinas foi coletado o sobrenadante das culturas mistas. Na Figura 21 verifica-se aumento de IL-1 β , IL-6 e TNF α nos grupos FPS ($p < 0.0001$; $p < 0.0001$ e $p < 0.0001$) e LPS ($p < 0.0001$; $p < 0.0001$; $p < 0.0001$) em relação ao controle. Vale destacar que para as citocinas IL-6 e TNF α o aumento é maior no grupo FPS em relação ao grupo LPS ($p < 0.001$ e $p < 0.05$) (FIGURA 21A, F). Em relação à citocina IL-12, foi detectada diminuição estatisticamente significativa nos grupos previamente expostos à fumaça do cigarro (FU, FPS) em relação ao grupo controle ($p < 0.0001$) e ao grupo LPS ($p < 0.0001$). Vale destacar que há uma diminuição da liberação da citocina IL-12 no grupo FPS em relação ao grupo apenas exposto à fumaça do cigarro ($p < 0.05$). Já o IFN γ ficou abaixo do limite de detecção (20 pg/mL) (Figura 21B).

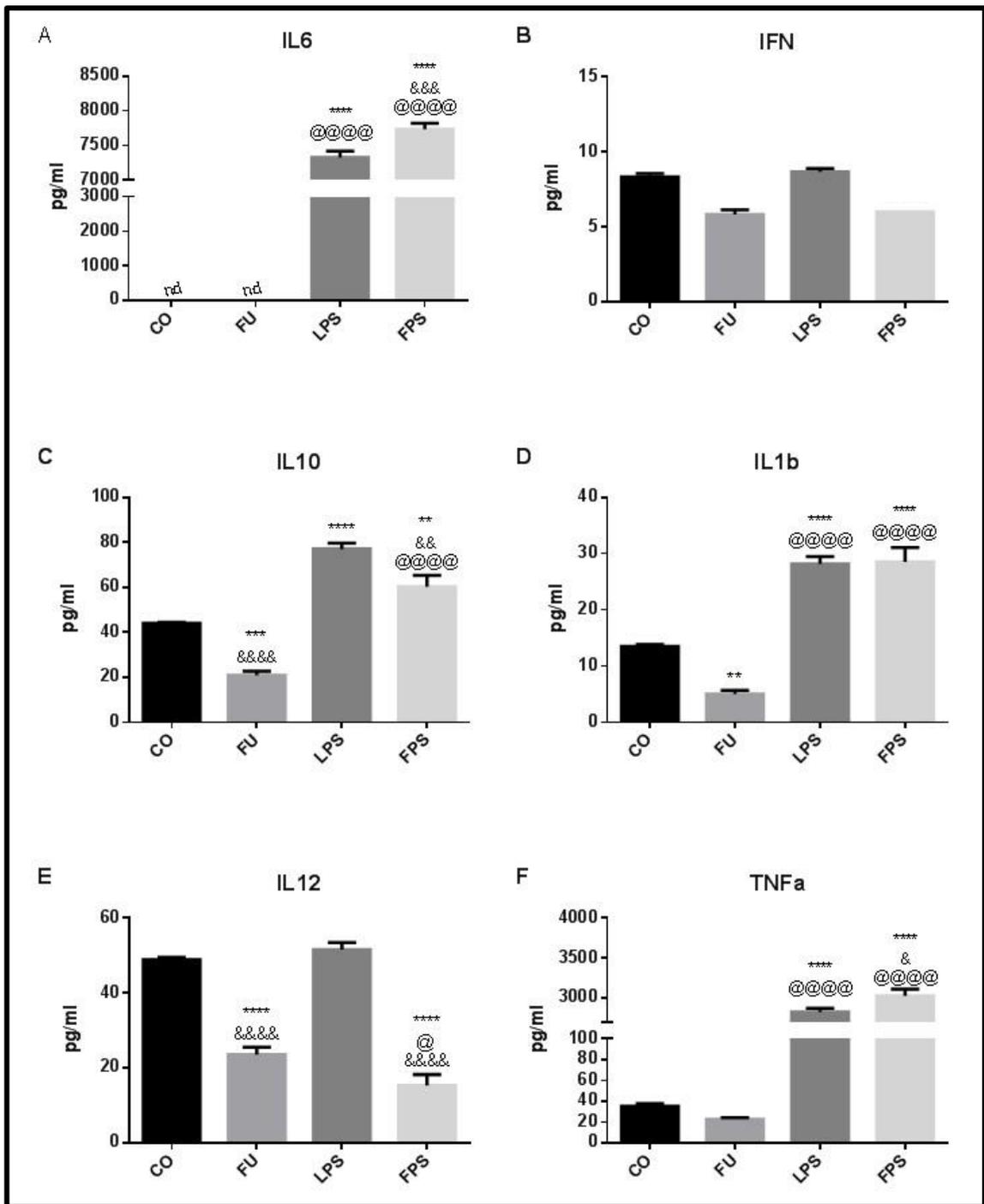


Figura 21: Dosagem das citocinas em cultura mista de glia. Técnica de CBA A) IL-6; B) IFN γ ; C) IL-10; D) IL-1 β ; E) IL-12; F) TNF α . Cultura mista de glia de animais expostos ou não à fumaça do cigarro, após realização da cultura, esta foi desafiada com LPS formando os grupos CO – exposto ao ar sintético e desafiado com meio; FU- exposto à fumaça do cigarro e desafiado com meio; LPS – exposto ao ar sintético e desafiado com LPS; FPS – exposto à fumaça do cigarro e desafiado com LPS (n=6. Análise estatística: One way Anova e post hoc Tuckey) “****” em relação ao CO; “@” em relação ao FU; “&” em relação ao LPS

4.3.4. Dosagem de Oxido Nítrico (NO)

Para avaliar a produção de NO total foi coletado o sobrenadante das culturas mistas de glia tratadas ou não com LPS. Na Figura 22 observamos que nos grupos FPS e LPS houve aumento da produção de NO quando comparada com os demais grupos ($p < 0.0001$).

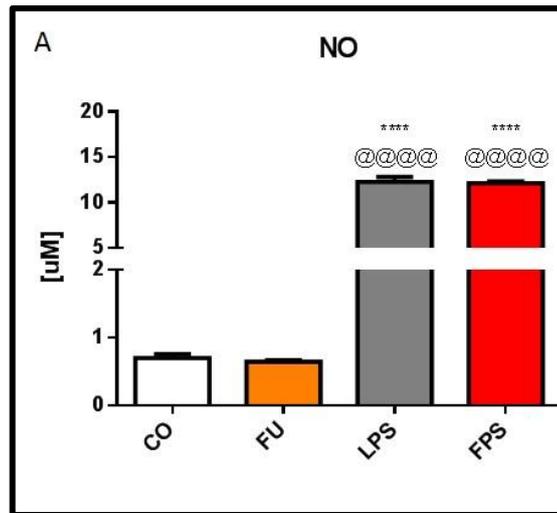


Figura 22: Dosagem de NO em cultura mista de glia. Cultura mista de glia de animais expostos ou não à fumaça do cigarro, após realização da cultura, a mesma foi desafiada ou não com LPS formando os grupos CO – exposto ao ar sintético e desafiado com meio; FU- exposto à fumaça do cigarro e desafiado com meio; LPS – exposto ao ar sintético e desafiado com LPS; FPS – exposto à fumaça do cigarro e desafiado com LPS. (n=6. Análise estatística: One way Anova e post hoc Tuckey). “*” em relação ao CO; “@” em relação ao FU; “&” em relação ao LPS

4.4. Mecanismos epigenéticos

Para entender quais os mecanismos responsáveis pelas alterações causadas nas células da glia, buscamos por alterações epigenéticas, como a metilação global e miRNAs.

4.4.1. Metilação Global

A taxa de metilação global foi realizada no encéfalo como um todo e em células da cultura mista de glia. A Figura 23 mostra que não houve alteração na metilação global em ambas as amostras utilizadas.

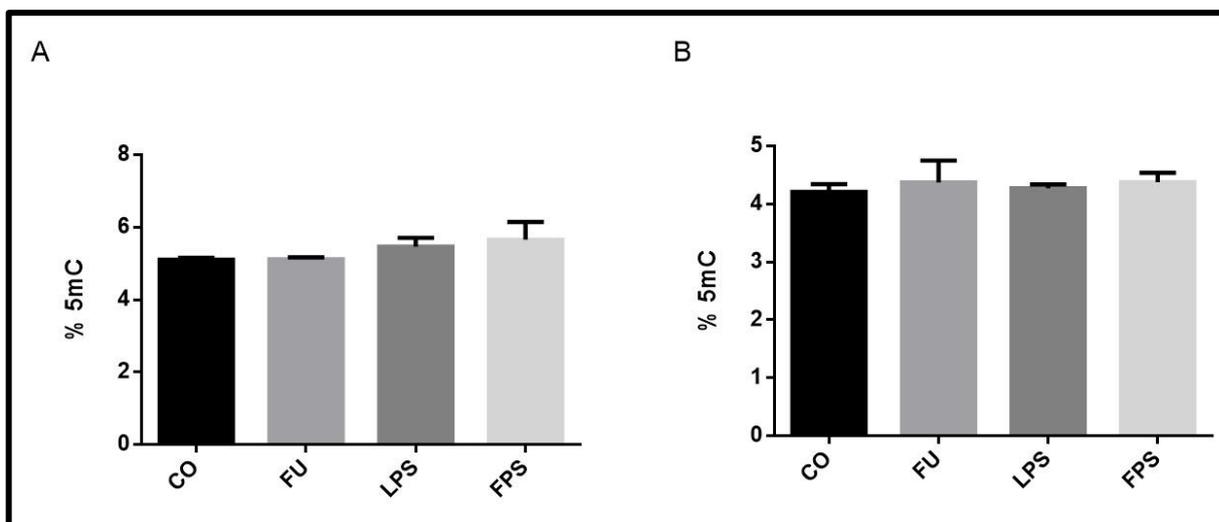


Figura 23: Avaliação de Metilação Global. A) Sistema nervoso central de animais expostos ou não à fumaça do cigarro durante o período gestacional e desafiados ou não com LPS no 3º dia de vida. B) Cultura mista de glia de animais expostos ou não à fumaça do cigarro, após realização da cultura, esta foi desafiada com LPS. Grupos experimentais: CO – exposto ao ar sintético e desafiado com meio; FU – exposto à fumaça do cigarro e desafiado com meio; LPS – exposto ao ar sintético e desafiado com LPS; FPS – exposto à fumaça do cigarro e desafiado com LPS (n=6. Análise estatística: One way Anova e posthoc Tuckey). “*” em relação ao CO; “@” em relação ao FU; “&” em relação ao LPS

4.4.2. Dosagem de miRNA

A quantificação dos miRNAs foi realizada nas células da cultura mista de glia, uma vez que o tecido como um todo poderia diluir os resultados. Na Figura 24 observamos aumento da transcrição do miRNA 146 no grupo apenas exposto à

fumaça do cigarro em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) e do miRNA 155 em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) e LPS ($p < 0,05$). No grupo exposto à fumaça do cigarro e desafiado com LPS houve aumento do miRNA 155 em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) e LPS ($p < 0,05$), sugerindo efeito da fumaça do cigarro nestes miRNAs. Para o miRNA 223 observamos aumento apenas no grupo LPS em relação ao controle ($p < 0,05$), não sendo observadas diferenças nos outros grupos.

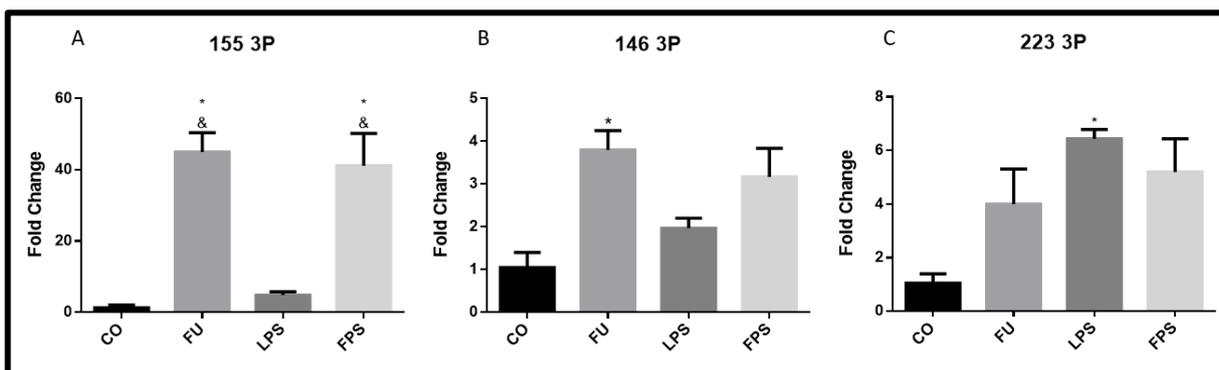


Figura 24: Avaliação de miRNA. Cultura mista de glia de animais expostos ou não à fumaça do cigarro, após realização da cultura, esta foi desafiada com LPS. Grupos experimentais: CO – exposto ao ar sintético e desafiado com meio; FU- exposto à fumaça do cigarro e desafiado com meio; LPS – exposto ao ar sintético e desafiado com LPS; FPS – exposto à fumaça do cigarro e desafiado com LPS (n=3. Análise estatística: One way Anova e posthoc Tuckey). “*” em relação ao CO; “@” em relação ao FU; “&” em relação ao LPS

4.5. Avaliação da interação de neurônios e células gliais em cultura

4.5.1. Avaliação de morte

Após verificar as alterações causadas pela fumaça do cigarro na resposta inflamatória das células da glia, nosso objetivo foi entender se esse processo de inflamação poderia alterar a viabilidade celular em uma cultura enriquecida com neurônio, e se este efeito é dependente da atividade da microglia. Assim, na Figura 25 destacam-se os "gates" representativos da análise de Anexina e PI em todos os grupos experimentais, com ou sem aminociclina, um inibidor de microglia.

Na Figura 26A, observamos diminuição da porcentagem de células vivas nos grupos FU e LPS em relação ao controle ($p < 0,05$; $p < 0,01$ respectivamente) e no grupo FPS em relação a todos os outros grupos experimentais (CO $p < 0,0001$; LPS $p < 0,01$;

FU $p < 0.0001$). A viabilidade celular volta aos níveis basais após tratamento com aminociclina.

Na Figura 26B observamos o inverso, há aumento na porcentagem de células em apoptose no grupo LPS em relação ao controle ($p < 0.01$) e no grupo FPS em relação ao grupo CO ($p < 0.0001$) e LPS ($p < 0.01$), porém quando há o tratamento com aminociclina a porcentagem de células em apoptose é reduzida e os níveis se equiparam ao controle. Em relação à porcentagem de células em necrose não há diferença significativa nos grupos estudados (FIGURA 26C).

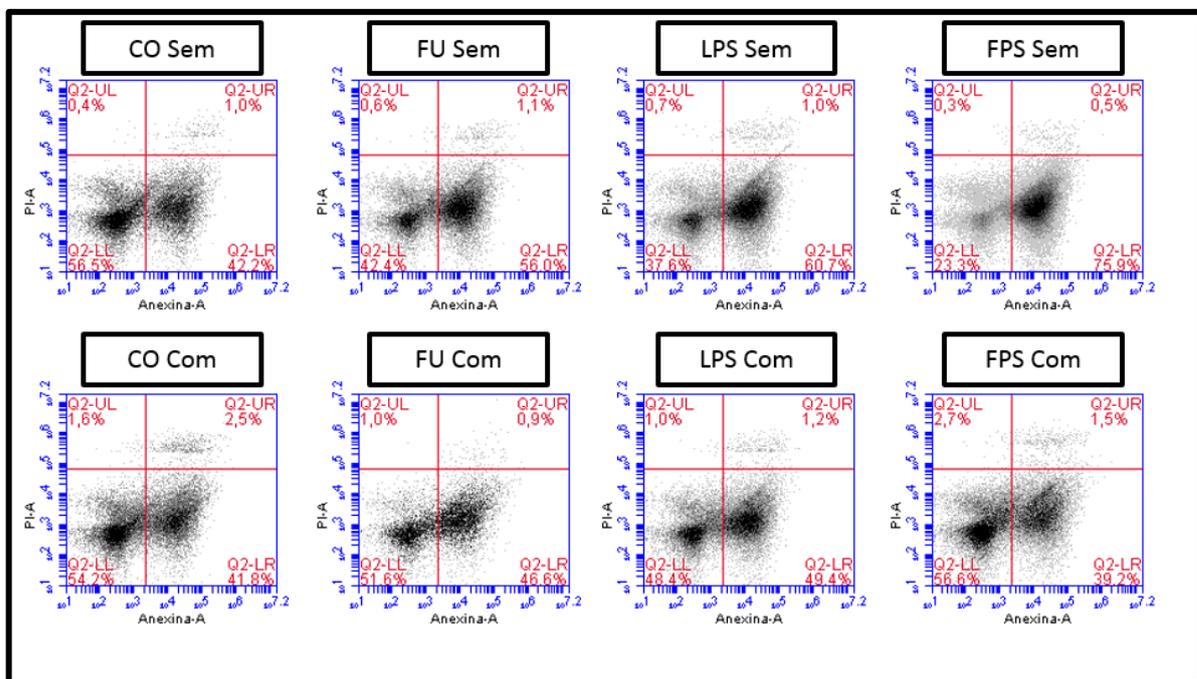


Figura 25: Gate representativo de Anexina e PI. Cultura enriquecida de neurônios de animais expostos ou não à fumaça do cigarro, após realização da cultura, esta foi tratada com aminociclina 24h antes do desafio com LPS formando os grupos CO – exposto ao ar sintético e desafiado com meio; FU- exposto à fumaça do cigarro e desafiado com meio; LPS – exposto ao ar sintético e desafiado com LPS; FPS – exposto à fumaça do cigarro e desafiado com LPS. “Sem” – ausência de aminociclina. “Com” – presença de aminociclina

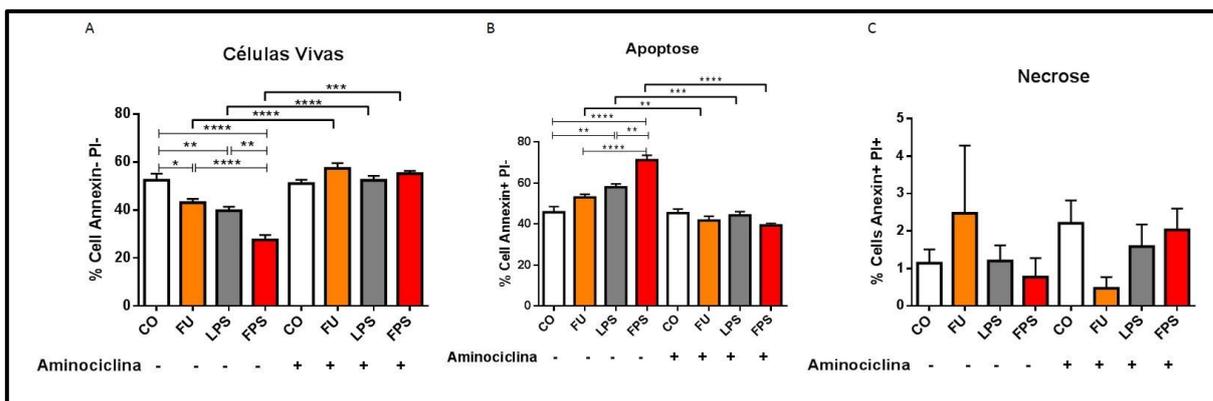


Figura 26: Dosagem de Anexina e PI em cultura enriquecida de neurônio. Cultura enriquecida de neurônios de animais expostos ou não à fumaça do cigarro, após realização da cultura, esta foi tratada com aminociclina 24h antes do desafio com LPS formando os grupos CO – exposto ao ar sintético e desafiado com meio; FU- exposto à fumaça do cigarro e desafiado com meio; LPS – exposto ao ar sintético e desafiado com LPS; FPS – exposto à fumaça do cigarro e desafiado com LPS. A) porcentagem de células vivas. B) porcentagem de células em apoptose. C) porcentagem de células em necrose. (n=6. Análise estatística: Onway Anova e posthock Tuckey).

4.5.2. Dosagem de Oxido Nítrico (NO)

Para avaliar a produção de NO total foi coletado o sobrenadante das culturas enriquecidas com neurônio tratadas ou não com aminociclina e LPS. Na Figura 27 observamos que no grupo FPS há um aumento da produção de NO em relação ao grupo CO ($p < 0.01$) e LPS ($p < 0.05$). Porém, ao bloquearmos a atividade das células da microglia com aminociclina verificamos que as concentrações de NO permaneceram iguais às do controle.

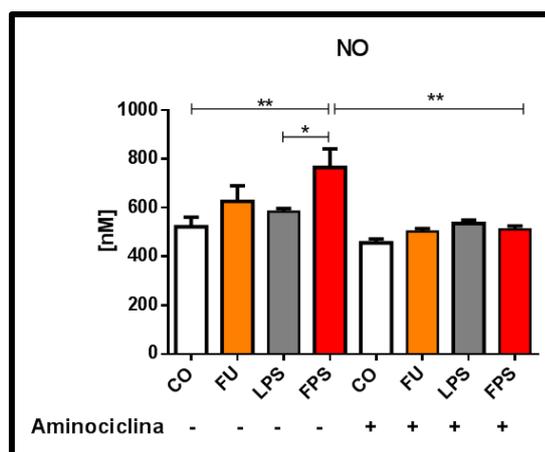


Figura 27: Dosagem de NO em cultura enriquecida de neurônio. Cultura enriquecida de neurônios de animais expostos ou não à fumaça do cigarro, após realização da cultura, esta foi tratada com aminociclina 24h antes do desafio com LPS formando os grupos CO – exposto ao ar sintético e desafiado com meio; FU- exposto à fumaça do cigarro e desafiado com meio; LPS – exposto ao ar sintético e desafiado com LPS; FPS – exposto à fumaça do cigarro e desafiado com LPS. (n=6. Análise estatística: One way Anova e post hoc Tuckey).

4.5.3. Dosagem de citocinas

Para a avaliação do perfil de citocinas foi coletado o sobrenadante das culturas de neurônio com e sem aminociclina. Podemos observar aumento significativo nas citocinas IL-6, TNF α e CCL2 dos grupos desafiados com LPS em relação ao grupo controle ($p < 0,001$) e fumante ($p < 0,001$) na presença de aminociclina. Vale destacar que há um aumento em relação à produção destas mesmas citocinas nas culturas em que há a presença de células da microglia.

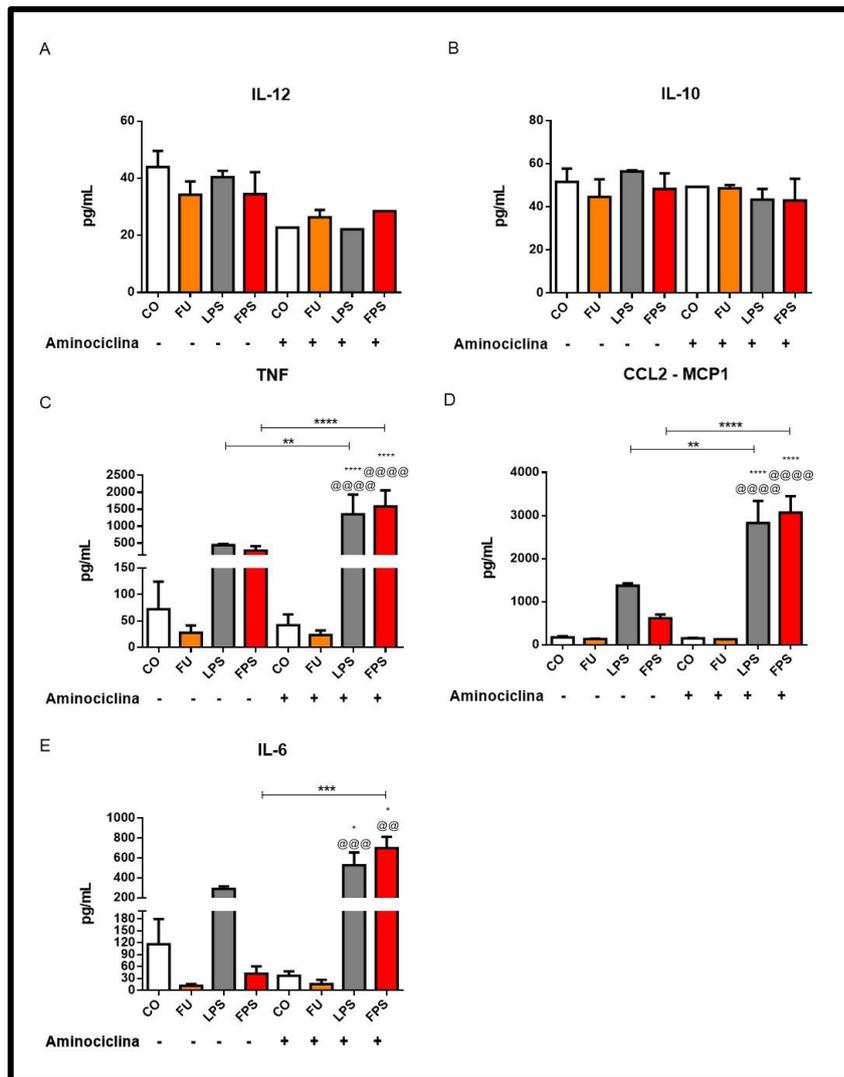


Figura 28: Dosagem das citocinas em cultura enriquecida com neurônio. Técnica de CBA A) IL-12; B) IL-10; C) TNF α ; D) CCL2; E) IL-6. Cultura enriquecida de neurônio de animais expostos ou não à fumaça do cigarro, após realização da cultura, esta foi tratada com aminociclina 24h antes do desafio com LPS formando os grupos CO – exposto ao ar sintético e desafiado com meio; FU- exposto à fumaça do cigarro e desafiado com meio; LPS – exposto ao ar sintético e desafiado com LPS; FPS – exposto à fumaça do cigarro e desafiado com LPS (n=6. Análise estatística: One way Anova e post hoc Tuckey) “*” em relação ao CO; “@” em relação ao FU; “&” em relação ao LPS

4.6. Avaliação das alterações causadas pela exposição da fumaça do cigarro *in útero* e suas repercussões na vida adulta

4.6.1. Encefalomielite autoimune experimental (EAE)

Com o intuito de verificar se as alterações causadas pela exposição à fumaça do cigarro durante o período gestacional são perpetuadas ao longo da vida realizamos o protocolo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE). Na Figura 29A observamos que os animais cujas mães foram previamente expostas à fumaça do cigarro na gestação apresentaram maior grau de doença, além de permanecer doentes por mais tempo quando comparados aos animais provenientes de prenhes expostas ao ar sintético. O mesmo se repete na curva apresentada na Figura 29B que mostra que os animais expostos à fumaça do cigarro durante o período gestacional apresentam maior grau de doença no 15º dia após a indução, período este que corresponde ao pico da doença. Este maior comprometimento dos animais expostos à fumaça do cigarro durante a gestação é corroborado pela área sob a curva apresentada nas Figuras 29C e 29D na qual observamos um aumento estatisticamente significativo nos animais fumantes em relação ao controle ($p < 0.01$).

Na Figura 29E pode-se verificar a variação do peso do dia da indução até o momento da eutanásia. Nos animais expostos à fumaça do cigarro há uma tendência a maior perda de peso.

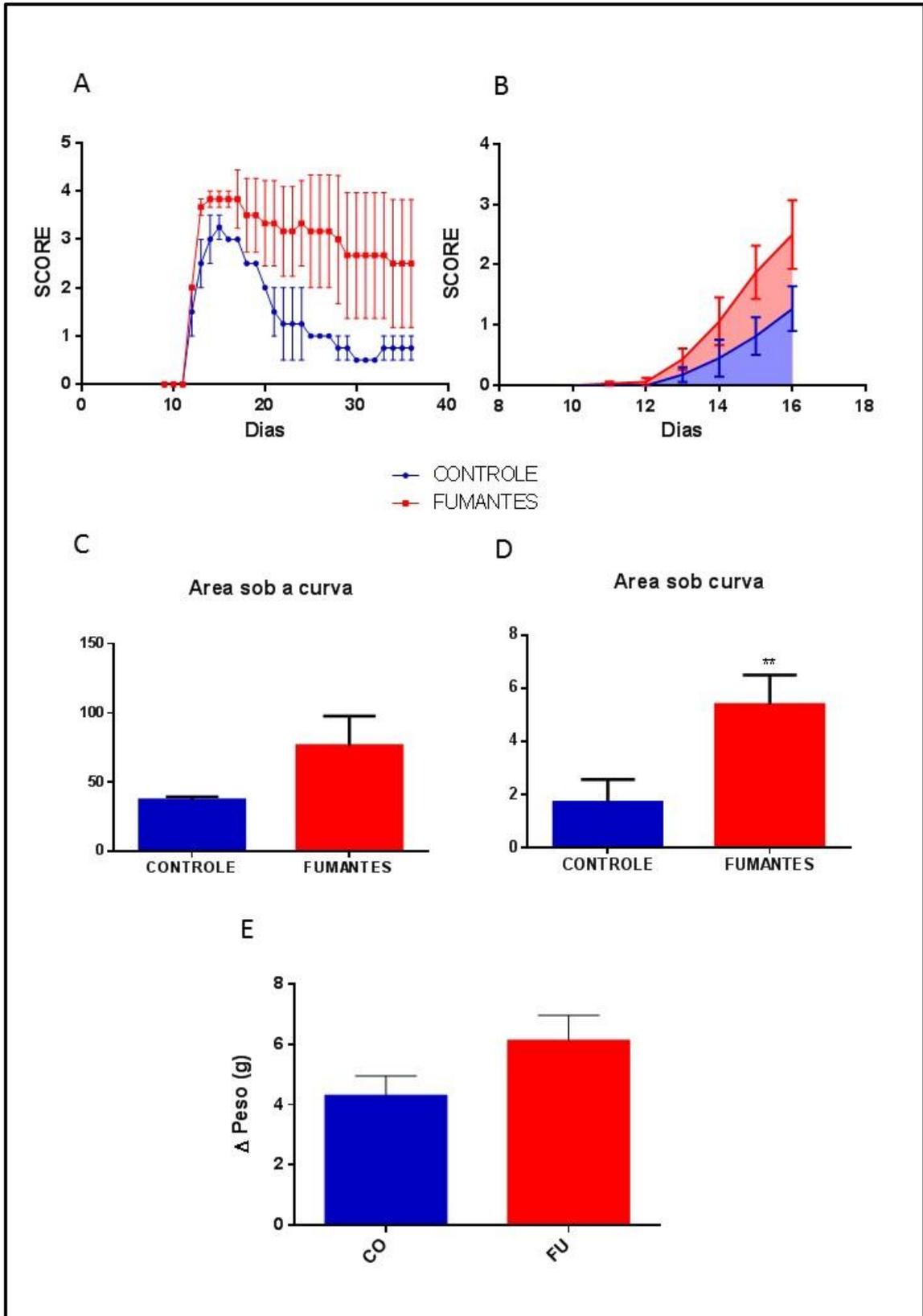


Figura 29: Avaliação do grau de EAE. Avaliação do grau de EAE nos animais expostos à fumaça do cigarro ou não. A) Curva de doença de 40 dias; B) Curva de doença acompanhada até o pico (15º dia). C) Avaliação da área sob a curva referente a curva de 40 dias. D) Avaliação da área sob a curva referente a curva B. E) Variação de perda de peso do dia da indução até o momento da eutanásia no pico. Análise estatística *T Student* * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Para avaliar a presença de leucócitos na medula espinal dos animais expostos ao protocolo da EAE foi realizada coloração de Hematoxilina & Eosina. Os animais expostos à fumaça do cigarro apresentam aumento do infiltrado inflamatório no pico (Figuras 31). Não houve alterações estatisticamente significativas no grau de infiltrado provavelmente devido ao número de animais utilizados, porém é possível verificar uma tendência nos animais expostos à fumaça do cigarro (FIGURA 32).

Em relação à desmielinização observada pela coloração de Luxol Fast Blue, podemos observar que há desmielinização em todas as lâminas analisadas (diminuição da intensidade da coloração azul), sendo que nos animais no pico da doença, podemos observar uma maior desmielinização nos animais expostos à fumaça do cigarro na contra coloração com Hematoxilina & Eosina, uma vez que o aumento do infiltrado pode ser co-localizado com a diminuição da mielinização (FIGURA 31).

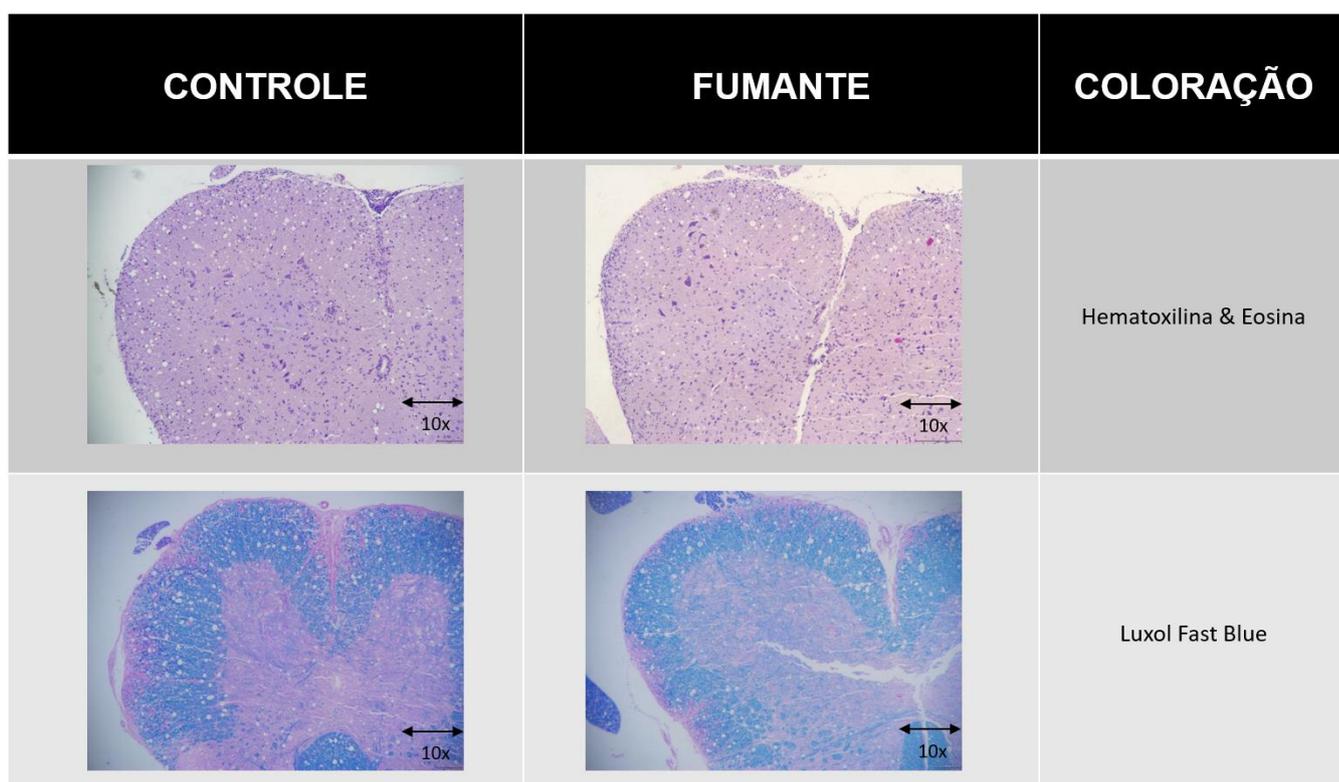


Figura 30: Marcação de Histologia dos animais com 40 dias de EAE. Coloração de Hematoxilina & Eosina ou Luxol Fast Blue. Cortes de medula no terço distal (n=2).

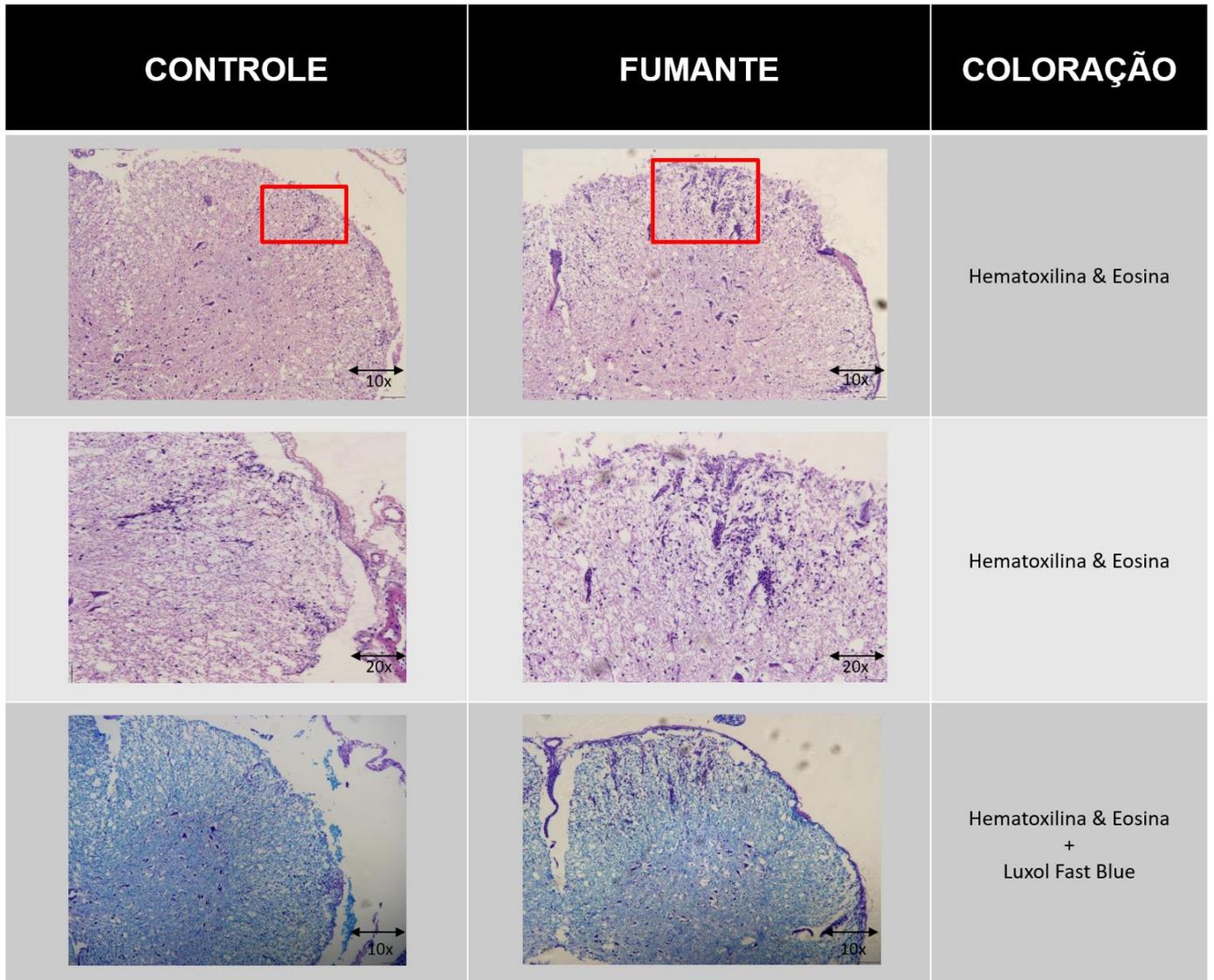


Figura 31: Marcação de Histologia dos animais no pico de EAE. Coloração de Hematoxilina & Eosina ou Luxol Fast Blue. Cortes de medula no terço distal (n=3).

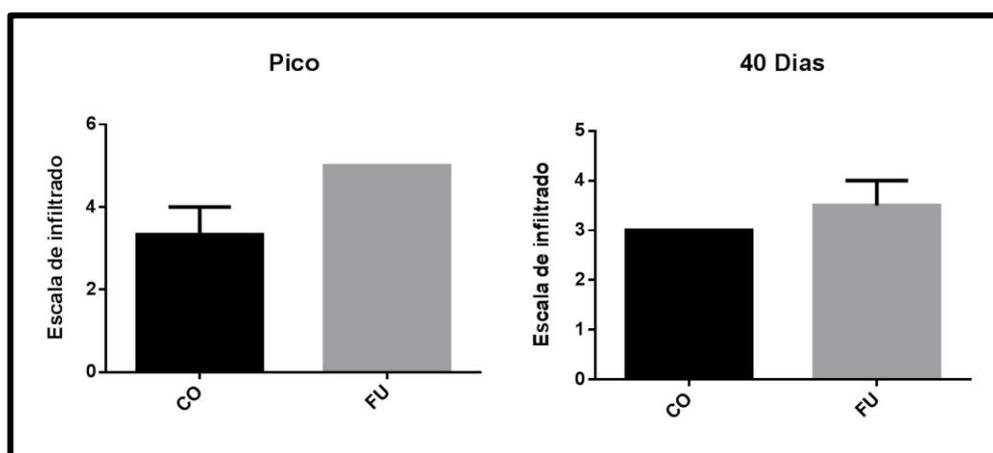


Figura 32: Grau de Infiltrado celular. Grau medido conforme descrito pelo método de SOELLNER et al., 2013.

Discussão

5. DISCUSSÃO

O fumo passivo é um problema de saúde pública e quando ocorre durante a gestação pode levar a importantes consequências na prole. Dentre essas consequências, destaca-se o retardo no desenvolvimento, déficit de atenção, alterações morfológicas como fenda labial, além de alterações do sistema imune, como predisposição à asma, bronquite e outras doenças do trato respiratório (CHISTYAKOV et al., 2010; GODDING et al., 2004; SALMÓRIA; OLIVEIRA, 2008; SINGH et al., 2011).

O enfoque do nosso grupo de pesquisa tem sido a avaliação dos efeitos da exposição à fumaça do cigarro durante o início do período pós-natal. Demonstramos previamente que a fumaça do cigarro é capaz de induzir um estado de estresse oxidativo em diversas regiões encefálicas (LOBO TORRES et al., 2012). Nossos resultados mostraram prejuízos ao processo de mielinização e diminuição das proteínas Olig-1 na infância e da proteína básica de mielina na adolescência e na fase adulta (TORRES et al., 2015a). No entanto, quando avaliamos proteínas pré e pós sinápticas no hipocampo, assim como o efeito dessa exposição na aprendizagem e memória, nossos resultados mostraram diminuição das proteínas e prejuízos no processo de aprendizagem e memória na infância sendo que alguns desses prejuízos mantiveram-se na adolescência e na fase adulta (TORRES et al., 2015b).

No presente estudo, realizamos a exposição de fêmeas prenhes à uma mistura de fumaça central e lateral com o intuito de mimetizar uma exposição passiva à fumaça de cigarro. Os valores de carboxihemoglobina (COHb) encontrados nesse trabalho foram semelhantes aos de trabalhos anteriores do nosso grupo, bem como condizentes com valores encontrados na literatura para exposição passiva de humanos (MELLO; PINTO; BOTELHO, 2001; TORRES-PACHECO, 2013).

Apesar da nicotina ser o componente da fumaça do cigarro responsável por causar a dependência, ela não é muito utilizada como marcador biológico de exposição uma vez que é rapidamente absorvida e metabolizada. Assim, seus metabólitos como a cotinina (COT) e a 3-hidroxicotinina (3HC) são os mais utilizados (MAN et al., 2006). Estes índices tem se tornando mais importantes no monitoramento de fumantes passivos quando o assunto é a exposição das crianças, uma vez que

elas passam a maior parte do tempo em suas residências, onde as políticas de controle de exposição não são aplicadas (MATT et al., 2006).

Cerca de 80% da nicotina absorvida é biotransformada em cotinina, sendo, portanto, seu principal metabolito no organismo humano. A cotinina possui baixa atividade farmacológica, e sua formação ocorre em 2 passos: o primeiro é a biotransformação de nicotina em íon de nicotina-imínio pela CYP2A6, e posteriormente este íon é metabolizado à cotinina pela aldeído oxidase citossólica. Por possuir uma meia vida de 17 horas, a concentração plasmática de cotinina pode ser facilmente correlacionada com a concentração plasmática de nicotina (LOCKMAN et al., 2005; TUTKA; MOSIEWICZ; WIELOSZ, 2005). A cotinina pode ser eliminada conjugada com ácido glicurônico (13%) pela urina, pode ser biotrasformada em 3-hidroxicotinina pela CYP2A6 (38%), ou em menores proporções em 5-hidroxicotinina, norcotinina ou cotinina-N-óxido. Como principal metabolito da cotinina, a 3-hidroxicotinina não possui efeitos farmacológicos e pode ser eliminada pela conjugação com o ácido glicurônico pela urina (BENOWITZ; JACOB, 2001; TUTKA; MOSIEWICZ; WIELOSZ, 2005).

A razão de 3-hidroxicotinina e cotinina (3HC/COT), conhecida como razão metabólica da nicotina, vem sendo utilizada como biomarcador fenotípico da atividade da enzima CYP2A6, como representação da taxa metabólica de nicotina e sua depuração total. A partir deste índice pode-se captar variações genéticas e ambientais, e pode ser relacionado com a ingestão de nicotina pelos fumantes (DEMPSEY et al., 2004; TANNER et al., 2015). Desta forma, metabolizadores rápidos possuem uma maior razão 3HC/COT e, portanto, maior predisposição a fumar ao longo do dia. BENOWITZ et al. (2003) mostraram que indivíduos que consomem cerca de 22 cigarros ao dia possuem uma razão de 5,2 quando os metabólitos são dosados na urina, confirmando assim a relação de ambos.

No presente estudo, encontramos valores de aproximadamente 33 ng/mL de cotinina no plasma das mães expostas à fumaça do cigarro, que está de acordo com o grupo de JOSEPH et al. (2013), que encontrou valores de 0,3 a 41 ng/mL de cotinina, sugerindo que crianças podem alcançar concentrações semelhantes a de fumantes ativos. GATZKE-KOPP et al. (2018) foram além e categorizaram a exposição de acordo com a quantidade de cotinina dosada em baixa $\leq 0,45$ ng/mL; média 0,46 – 12 ng/mL e alta ≥ 12 ng/mL. Vale destacar que JARVIS et al. (2008) sugerem que a

concentração de 12 ng/mL seria o ponto de *turnover* entre fumantes passivos e ativos. Neste contexto, podemos categorizar a nossa exposição como alta de acordo com os trabalhos acima citados.

Uma grande dificuldade encontrada neste trabalho foi em relação à taxa de prenhez das fêmeas durante o período de exposição à fumaça de cigarro e ao ar sintético. Tanto no grupo controle quanto no grupo fumante, houve um pequeno número de fêmeas que continuaram prenhes até o final do protocolo (média de 38%), levando a uma diminuição do número de filhotes esperados ao final da exposição e a necessidade de realização de mais exposições do que o previsto. Este dado pode ser observado através do peso das fêmeas prenhes no anexo 8.4, na qual verificamos que o número de fêmeas por exposição é bem variado.

A exposição passiva à fumaça do cigarro pode reduzir a fertilidade materna, atrasando em mais de 1 ano a concepção do primeiro filho. Estudo publicado pelo grupo de JENSEN et al., (1998) descreveu que a exposição intrauterina à fumaça do cigarro diminui em 50% a fertilidade dos filhos de mães fumantes, sejam eles homens ou mulheres. Sabe-se que o estresse materno causa alterações durante o período gestacional como falha na implantação, abortos espontâneos recorrentes, parto prematuro espontâneo e anormalidades do desenvolvimento do feto (MELLO; PINTO; BOTELHO, 2001). LIU et al., (2015) mostraram que um processo inflamatório agudo, com aumento de radicais livres durante o período de implantação do embrião pode gerar alterações morfofuncionais no útero que impedem a implantação do embrião. Desta forma é esperado que uma exposição diária durante todo o período gestacional diminua o número de fêmeas efetivamente prenhes após os 21 dias.

Vale destacar que durante a exposição gestacional o feto está exposto tanto aos componentes da fumaça do cigarro que atravessam a barreira placentária o que gera espécies reativas do oxigênio e hipóxia, como também altera a oxigenação e o metabolismo placentário (MELLO; PINTO; BOTELHO, 2001). Mais ainda, foi também relatado que a contenção de fêmeas de roedores prenhes por 45 minutos dos dias G12 a G21 pode levar à diminuição do peso corpóreo (LIU et al., 2014a).

A relação da ingestão de alimentos e a perda de peso em animais expostos à fumaça do cigarro já é bem descrita na literatura. CHEN et al. (2006) observaram que a exposição à fumaça do cigarro reduz em torno de 31% o consumo de ração no primeiro dia de exposição, permanecendo reduzido ao longo dos demais dias. Nossos

resultados estão condizentes com os achados na literatura uma vez que as fêmeas expostas à fumaça do cigarro ingeriram 24% menos ração que as expostas ao ar sintético, e este efeito pode ser decorrente da diminuição do neuropeptídeo Y (NPY) no núcleo paraventricular (CHEN et al., 2006). De fato, o NPY é um neurotransmissor de 36 aminoácidos que possui um potente efeito estimulador do apetite. Sua resposta é em parte derivada de menores concentrações de leptina, hormônio liberado pelos adipócitos, e da diminuição de massa gorda. Quando há uma queda na ingestão calórica, as concentrações plasmáticas de leptina se alteram e o hipotálamo, na região do núcleo arqueado, libera NPY na região paraventricular exercendo seu efeito orexígeno (ZARJEVSKI et al., 1993).

Com a diminuição na ingestão calórica é esperado que os animais ganhem menos peso, conforme mostrado em diversos estudos (CHEN et al., 2006; HAUG; HEINBERG; GUARDA, 2001; TIZABI et al., 1997; TORRES et al., 2015a). Em nosso trabalho não encontramos diferenças significativas entre as fêmeas expostas à fumaça do cigarro e as fêmeas controle. Entretanto, como trabalhamos com gestantes, as mesmas tendem a ganhar peso devido à ninhada, fato que podemos observar ao relacionar o primeiro e o último dia das fêmeas.

O baixo peso ao nascer da prole exposta à fumaça do cigarro é um tema abordado em diversos estudos e é esperado (OBOT et al., 2004; SALMÓRIA; OLIVEIRA, 2008; TORRES-PACHECO, 2013). Em nossos experimentos encontramos uma diferença estatisticamente significativa no peso da prole das fêmeas expostas à fumaça do cigarro em relação às expostas ao ar sintético. Tal fato se dá pela privação de nutrientes ao feto devida à diminuição da ingestão de ração da mãe ou ao efeito da fumaça do cigarro propriamente dito. A redução do peso ao nascer pode trazer sérias consequências, uma vez que está relacionada aos altos índices de morbidade e mortalidade infantil. A exposição pré-natal à nicotina de maneira crônica compromete o desenvolvimento do SNC, alterando principalmente o tempo e a intensidade do desenvolvimento celular, comprometendo desta forma o neurodesenvolvimento (MORMILE et al., 2013).

Com o intuito de verificar um panorama do processo inflamatório no sistema nervoso central da prole de mães expostas à fumaça do cigarro durante todo o período gestacional, avaliamos o perfil transcricional no SNC da prole. Todas as alterações encontradas mostram que o SNC está se modificando com o intuito de responder ao

processo inflamatório ali instalado, uma vez que observamos um aumento na transcrição de genes responsáveis pelo recrutamento celular como CCL2, CCL5, CXCL10 e CXCL11, além de aumento na transcrição das moléculas de adesão como e-selectina (Sele), p-selectina (Selp) e Icam. Desta forma, podemos inferir que o SNC tenta recrutar células da periferia para auxiliar na resposta ao processo inflamatório (BOSE; CHO, 2013). Tal fato é corroborado por trabalho recente que mostrou que a injeção intra-cérebro ventricular (icv) de TNF- α alterou a população de linfócitos T na periferia (ARESTI SANZ; EL AIDY, 2019).

As quimiocinas são uma família de pequenas proteínas com atividade quimioatrativa, sendo divididas em 4 subfamílias de acordo com os resíduos de cisteína na porção N terminal da proteína. Estas subfamílias são nomeadas de C, CC, CXC e CX3C. CCL2 foi a primeira a ser descoberta e ainda permanece a de maior ênfase nos trabalhos publicados (ROSTÈNE et al., 2011). Diversos estudos mostram que a quimiocina CCL2 não está presente apenas durante a inflamação, mas sim de maneira constitutiva em regiões específicas do SNC, como por exemplo no cerebelo, córtex e substância negra. Estes achados sugerem que as quimiocinas possuem um papel fundamental na comunicação entre as células da glia, como astrócitos e microglia com os neurônios, uma vez que os neurônios também são capazes de expressar CCR2 (CONDUCTIER et al., 2010; ROSTÈNE et al., 2011).

Em nossos experimentos, podemos verificar a instalação de um processo neuroinflamatório, com aumento das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 nas células da microglia, além de observamos o aumento da transcrição e da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF α e de segundos mensageiros como o NO (FIGURA 22). Vale destacar que foi possível observar o aumento de CD86 nos grupos apenas expostos à fumaça do cigarro em relação ao grupo controle, evidenciando o potencial estimulador dos componentes da fumaça do cigarro sobre as células residentes do SNC.

No decurso de uma injúria ao SNC, as células da microglia são recrutadas a partir da liberação de quimiocinas e citocinas por astrócitos e neurônios. Ao chegar no local do dano, as células da microglia se ativam e passam a expressar em sua superfície, moléculas que facilitam a internalização de debris ou matriz extracelular para subsequente apresentação aos linfócitos T (PAOLICELLI et al., 2011). Desta forma, as células da microglia mudam sua morfologia de ramificadas para ameboides,

além de alterar suas propriedades funcionais. Dependendo do estímulo externo, as microglias podem se diferenciar em dois principais tipos, sendo o M1 o mais pró-inflamatório. Este perfil é responsável pela liberação de citocinas como IL-6 e TNF α , além de levar ao aumento da produção de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio com o intuito de solucionar o processo inflamatório (VON BERNHARDI; EUGENÍN-VON BERNHARDI; EUGENÍN, 2015). Nossos resultados sugerem que a fumaça do cigarro estimula a polarização da microglia para o tipo M1, uma vez que observamos o aumento de citocinas como IL-6 e TNF α , aumento dos marcadores de superfície CD86, além do aumento da produção de NO, nos grupos que foram expostos à fumaça do cigarro e desafiados com LPS.

A resposta proveniente da ativação celular no SNC, quando transiente, é benéfica para o organismo. Como exemplo, podemos citar a ativação do receptor de IL-1 (IL-1r), que é importante para a repopulação de microglias depletadas do sistema (BRUTTGER et al., 2015). Outra interação interessante é a comunicação entre linfócitos T e células residentes do SNC, que tornam a neuroinflamação importante para a memória e o aprendizado (ZIV et al., 2006). Entretanto, a ativação exagerada, amplificada e crônica das células da microglia pode levar a alterações funcionais importantes, e que culminam em mudanças comportamentais como depressão e déficit cognitivo (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016).

Para averiguar se as alterações causadas pela ativação da microglia em nosso modelo eram prejudiciais às células nervosas, investigamos a viabilidade celular em uma cultura que possui os três tipos celulares: astrócitos, células da microglia e neurônios. Podemos observar que na cultura proveniente de neonatos expostos à fumaça do cigarro e desafiada com LPS há uma diminuição na viabilidade celular e um aumento da porcentagem de células em apoptose em relação ao controle. Nossos dados são compatíveis com os encontrados na literatura, uma vez que, o aumento do processo neuroinflamatório é capaz de influenciar diretamente a morte por apoptose, causando danos neurológicos e conseqüentemente acelerando processos de neurodegeneração (SHABAB et al., 2017).

Um dos mecanismos que pode levar à morte celular é a produção e liberação de NO pela enzima iNOS das células da microglia e astrócitos. O NO pode causar a morte neuronal por impedir a respiração celular, o que aumenta a liberação de glutamato levando à excitotoxicidade via receptor NMDA. Por necessitar de grandes quantidades

de iNOS para levar à excitotoxicidade, sugere-se que o NO se ligue ao ânion superóxido, liberado pela NADPH oxidase das células da microglia, levando à morte devido à formação do ânion peroxinitrito (LYMAN et al., 2014a).

Para responder se este efeito era decorrente da ativação da microglia, utilizamos um bloqueador da atividade da microglia, a aminociclina. A aminociclina é uma tetraciclina semi-sintética utilizada há mais de 30 anos para o tratamento de acne e rosácea. Por possuir alta lipossolubilidade é capaz de penetrar a barreira hematoencefálica e atingir o sistema nervoso central (HSIEH et al., 2018). Descrita primeiramente em 1998 como neuroprotetora, a aminociclina reduz a ativação e a proliferação das células da microglia, além de diminuir a liberação de espécies reativas do oxigênio e da produção de NO (YONG et al., 2004). Em nossos resultados, podemos observar que a liberação de NO é devido à atividade da microglia, uma vez que com o seu bloqueio pela aminociclina observamos uma diminuição de sua liberação e, conseqüentemente uma diminuição das células em apoptose. Esses dados corroboram a hipótese de que a morte celular observada é causada pelo aumento da liberação de NO. Em contraposição à dosagem de NO, encontramos um aumento da liberação de citocinas na presença de aminociclina. Este fato pode ser explicado por trabalhos acumulados nos últimos 20 anos que sugerem que os astrócitos, apesar de serem essenciais para a manutenção da homeostase tecidual, também podem responder aos danos sofridos pelo SNC por meio de um processo chamado astrogliose (SOFRONIEW, 2015).

O processo de astrogliose é dependente do tempo e do microambiente em questão, podendo alterar sua resposta de benéfica para prejudicial ao sistema. Para demonstrar sua importância no decorso do processo inflamatório, BRAMBILLA et al. (2005) desenvolveram um camundongo que superexpressa a isoforma dominante negativa do I κ B α , impedindo, nos astrócitos, a translocação do NF- κ B para o núcleo. Com este modelo, eles mostraram que a ausência de ativação da via do NF- κ B nos astrócitos está relacionada com uma melhora no prognóstico de doenças neuroinflamatórias como acidente vascular cerebral; isquemia de retina; além do modelo murino de esclerose múltipla (EAE). Estes achados são importantes para salientar que o bloqueio da via do NF- κ B nos astrócitos é suficiente para reduzir a carga inflamatória sustentada pelas células residentes no SNC.

Outra via de ativação dos astrócitos que merece destaque é a sinalização da via do ativador de transcrição 3 (STAT3). Durante injúrias teciduais há o aumento da transcrição e fosforilação de STAT3 principalmente em astrócitos e neurônios, sua ativação se relaciona com o nível da inflamação e do tamanho da lesão. Desta maneira, podemos destacar a ativação dos astrócitos pela liberação de diversas moléculas bioativas, como citocinas, quimiocinas, que são capazes de elevar o processo de neuroinflamação (COLOMBO; FARINA, 2016). Quando ativados, os astrócitos, tem como principais funções: (i) aumentar a neuroproteção e o suporte trófico dos neurônios prejudicados; (ii) isolar a área afetada do restante do SNC; (iii) reconstrução da BHE; e (iv) facilitar a remodelação dos circuitos neuronais em algumas situações específicas. (PEKKNY et al., 2016).

A persistência de células da microglia e astrócitos ativados durante longos períodos contribui para a progressão das doenças neurodegenerativas, bem como o aparecimento de uma microglia envelhecida durante a fase adulta, uma vez que esta possui um tempo de *turnover* mais demorado. Estudos neurofisiológicos e neuroradiológicos demonstram que o processo de inflamação contínua ocorre antes do início da perda neuronal gerada com a progressão da neurodegeneração (CUNNINGHAM, 2013).

Estudos mostraram que a ativação das células da microglia acelera a neurodegeneração em resposta à inflamação sistêmica. Como exemplo, podemos citar a fisiopatologia da doença de Alzheimer, em que um aumento crônico na liberação de citocinas pró-inflamatórias aumenta a síntese de proteína APP e a fosforilação da tau. Vale ressaltar que citocinas como TNF α e IL-1 β foram descritas como *primers* para clivagem de APP pela via da MAPK (LYMAN et al., 2014b).

Outra doença relacionada aos processos neuroinflamatórios é a Esclerose Múltipla. Sua fisiopatologia está diretamente ligada à inflamação do sistema nervoso central e à desmielinização (LYMAN et al., 2014b). A Esclerose Múltipla é caracterizada por uma desmielinização progressiva da substância branca, com formação de placas características de infiltrado celular. Clinicamente, os sintomas neurológicos podem variar de leve a grave e tipicamente acometem os sistemas sensoriais (formigamento, dormência, tonturas e distúrbios visuais) e motores (fraqueza, dificuldade em andar, tremores, falta de coordenação e dificuldade dos

controles excretores) além de pacientes relatarem sensibilidade ao calor, alterações emocionais, cognitivas e sexuais (BRONNER et al., 2010).

Patologicamente, a resposta se inicia com a ativação de linfócitos T CD4 e CD8 periféricos contra epítomos de mielina, que posteriormente migram e infiltram o SNC. Após serem re-ativadas *in situ* por células dendríticas residentes (BAILEY et al., 2007) e células da microglia (PONOMAREV et al., 2005), os linfócitos passam a secretar uma série de citocinas pró-inflamatórias que induzem a ativação de mais astrócitos, células da microglia e células endoteliais, aumentando assim o processo inflamatório local. Apesar de importantes para o início da resposta, não são os linfócitos T CD4 os responsáveis pela morte dos oligodendrócitos, mas sim macrófagos e linfócitos T CD8 por meio da liberação de espécies reativas do oxigênio e TNF α , ou granzimas e perforinas, respectivamente (GOVERMAN; PERCHELLET; HUSEBY, 2005; MULLER et al., 2012; PERON et al., 2010).

Um dos primeiros trabalhos a relacionar o hábito de fumar com a Esclerose Múltipla (EM) foi publicado em Israel no ano de 1965. Porém, foi só na década de 1990 que dois grupos distintos realizaram experimentos longitudinais de larga escala e puderam relacionar o hábito regular de fumar em mulheres com a maior incidência de desenvolvimento da Esclerose Múltipla (JAFARI; HINTZEN, 2011; WINGERCHUK, 2012). De fato, estudos mais recentes mostram que fumantes ativos têm mais de 50% de chance de desenvolver EM, enquanto que este risco passa para 30% em fumantes passivos e para mais de 2 vezes quando estes fumantes passivos são crianças, além de desenvolverem uma doença com sintomas motores mais agressivos. Em relação à mortalidade, os pacientes com EM que são fumantes ativos ou ex-fumantes têm de 2 a 4 vezes mais risco de mortalidade do que pacientes com EM que nunca fumaram na vida (ALROUJI et al., 2018).

Nosso trabalho utilizou um modelo murino de Esclerose Múltipla, a Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), que possui grandes semelhanças com a doença humana. Sua indução se dá com a inoculação de antígenos de mielina (MOG) emulsificados em CFA (do inglês, *Complete Freund Adjuvant*), o que leva a uma massiva ativação do sistema imune com produção de citocinas, quimiocinas e expansão clonal das células encefalitogênicas, tendo como consequência o rompimento da barreira hemato-encefálica e inflamação do SNC (FRIESE et al., 2006). Com o intuito de aumentar a transmigração celular é adicionado a toxina *Bordetella pertussis* no processo de

imunização, que possui um papel importante na ativação das células endoteliais da barreira hematoencefálica pelo receptor TLR-4 (RACKE; HU; LOVETT-RACKE, 2005). A ativação deste receptor em astrócitos é responsável pela liberação de IL-6 e quimiocinas, aumentando o recrutamento de células potencialmente inflamatórias para o local. Após a infiltração celular, há produção de citocinas como IL-1, IL-6, IL-12, IL-17, entre outras que aumentam a permeabilidade vascular e conseqüentemente a infiltração celular (FARINA et al., 2005).

Em nossos resultados, podemos verificar a influência da exposição gestacional na clínica e na atividade celular, uma vez que observamos um aumento no grau da doença bem como uma persistência da mesma na curva temporal da encefalomielite autoimune experimental. Além destes achados, os animais expostos à fumaça do cigarro possuem um grau maior de infiltrado celular e desmielinização. Assim, uma vez que as influências ambientais, ou seja, a exposição à fumaça do cigarro, ocorreram apenas durante o período da vida intrauterina e as alterações foram observadas na vida adulta, sugere-se que houve um processo de programação fetal importante, e que culminou na hiperativação de células imunes periféricas, como linfócitos, e também centralmente, como microglia e astrócitos.

O novo entendimento gerado de que a saúde e o bem-estar no decorrer da vida adulta podem ser influenciados por alterações epigenéticas durante a vida intrauterina fez com que diversos pesquisadores voltassem suas perguntas para as exposições gestacionais. A programação fetal constitui em alterações epigenéticas que modelam o desenvolvimento de órgãos e tecidos, podendo alterar suas respostas celulares. Estas alterações quando exacerbadas em sua função levam, por exemplo, a uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (BARLOW et al., 2007; FAA et al., 2016).

Os fatores epigenéticos presentes no período gestacional e que podem influenciar no neurodesenvolvimento podem ser divididos em dois grupos principais: os relacionados à mãe, como dieta, tabagismo, alcoolismo, hipertensão, estresse, exposição a toxicantes ambientais entre outros; e os relacionados ao feto como hipóxia, insuficiência placentária, prematuridade e restrição de crescimento intrauterino (AL-GUBORY, 2014; LYALL; SCHMIDT; HERTZ-PICCIOTTO, 2014). PIRAS et al. (2014) sugerem que as alterações destes fatores epigenéticos podem modular o desenvolvimento neuronal resultando na variabilidade interindividual do

número de neurônios e células da glia no nascimento. De fato, JADAVJI et al. (2015) mostraram que uma dieta materna deficiente em doadores de grupo metil como colina e folato em camundongos C57BL/6 prenhes leva ao aumento da morte por apoptose em neurônios hipocampais, ocasionando um déficit de memória na prole.

Várias evidências apontam que a exposição materna à fumaça do cigarro está relacionada às alterações em componentes chaves do neurodesenvolvimento, como a formação do córtex pré-frontal, hipocampo e o estriado por exemplo. Estas modificações são capazes de levar a alterações psicológicas, comportamentais e cognitivas na vida adulta, representando a base para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Hoje sabe-se que estas alterações são de cunho epigenético, representado por alterações de metilação do DNA e acetilação de histonas, além das regulações pós-transcricionais, como aquelas mediadas pelos miRNAs. (FAA et al., 2016). O processo de metilação do DNA envolve a adição de grupos metila (CH_3) na posição 5' da citosina, sendo realizada pela ação de três membros cataliticamente ativos das enzimas DNA metiltransferases (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b), originando a 5-metil-2'-desoxicitidina (5-mdC). De 2 a 5% do total de citosinas do DNA humano estão na forma metilada, sendo, portanto, o quinto desoxinucleosídeo mais abundante no DNA. Além disso, o padrão de 5-mdC no DNA é precisamente preservado por herança mitótica pela ação de DNMTs (BIRD, 2007).

Um estudo realizado por Eckhardt *et. al.* (2006), mostrou que 30% das ilhas CpGs não estão metiladas, 40% estão hipermetiladas e 30% são metiladas de uma maneira intermediária. Esta variação está relacionada com a forma de regulação gênica, uma ilha CpG metilada em uma região promotora é capaz de recrutar proteínas e fatores que se ligam ao DNA, alteram a conformação das histonas, desta forma a cromatina fica mais fechada e impede a ligação de fatores de transcrição com o DNA. Pode-se dizer que a metilação do DNA é uma forma de inibição da transcrição e, portanto, uma forma de regular o processo transcricional (BREILING; LYKO, 2015).

Alterações nos padrões de metilação do DNA estão presentes em doenças autoimunes, condições neurológicas e psiquiátricas, e câncer. Células tumorais apresentam de forma característica uma perda da metilação global do DNA (hipometilação), acompanhada por hipermetilações focais, o que pode levar à instabilidade genômica (hipometilação) e silenciamento transcricional de genes

supressores de tumor (hipermetilação de regiões promotoras) (DAHL; GRONBAEK; GULDBERG, 2011; DOI et al., 2009; IRIZARRY, 2009).

Alterações nos padrões de metilação gênica podem ocorrer durante toda a vida, porém é entre o período de embriogênese e o início do período de desenvolvimento fetal que tais alterações são estabelecidas. Neste período, influências externas como a exposição à fumaça do cigarro podem alterar os padrões epigenéticos dos fetos (IVORRA et al., 2015).

Estudos apontam que a exposição pré-natal de maneira crônica à nicotina, substância capaz de atravessar a barreira placentária e a hematoencefálica, compromete o desenvolvimento do sistema nervoso central, alterando principalmente o tempo e a intensidade do desenvolvimento celular, comprometendo desta forma o “programa” de neurodesenvolvimento (MAGGIO et al., 1998; MORMILE et al., 2013).

Não só a exposição ao fumo ativo pode prejudicar o desenvolvimento do SNC, diversos trabalhos relatam que a exposição passiva a fumaça do cigarro pode causar danos em seu desenvolvimento, levando a uma diminuição de seu tamanho, principalmente na densidade de regiões como cerebelo e corpo caloso. Estas alterações morfológicas podem causar prejuízo nas funções cognitivas, o que foi destacado por LEE et al., 2011 e MUND et al., 2013 que mostraram que filhos de mães fumantes possuem comprometimento da compreensão verbal e linguística e alteração na integração dos sistema motor e visual.

Os mecanismos pelas quais estas diminuições estruturais acontecem é um tema que vem sendo muito discutido. TOLEDO-RODRIGUEZ et al. (2010) sugerem que a fumaça do cigarro ao hipermetilar a região promotora do gene da neurotrofina BDNF é capaz de interferir na formação do SNC, levando às consequências observadas na vida adulta. Já o grupo de MUKHOPADHYAY et al. (2010) sugere que a exposição intrauterina à fumaça do cigarro pode alterar genes chave nos processos de neurogênese, função sináptica, encaminhamento dos axônios e sobrevivência celular no hipocampo.

Em nossos resultados não encontramos alterações na metilação gênica global em nenhum grupo experimental, porém apenas com esta informação não podemos sugerir que não houve alterações epigenéticas. Por se tratar de uma análise global, alterações sutis em genes específicos ficam difíceis de serem percebidas. Desta forma, para responder a nossa pergunta das influências epigenéticas, realizamos a

dosagem dos miRNAs na cultura de mista de glia, uma vez que as células da microglia e os astrócitos são os principais alvos dos miRNAs na neuroinflamação (GAUDET et al., 2018).

Os microRNAs (miRNA ou miR) são pequenas moléculas de RNA não codificante, de 19 a 22 nucleotídeos, preservadas de maneira evolucionária com função de regulação genica. Seu mecanismo de ação consiste em se ligar na extremidade não traduzida do mRNA, levando-o diretamente a degradação. Existem mais de 5.000 miRNAs descritos na literatura, sendo que cada um com uma sequência única é capaz de inibir mais de mil alvos de mRNA (NEAL; RICHARDSON, 2018). Mais de 60% dos genes codificadores de proteína são regulados pelos miRNAs (GHARIBI et al., 2019). Sua biogênese se inicia na transcrição nuclear pela RNase II Droscha e seu co-fator DGCR8/Pasha. Após este processo o precursor do miRNA é exportado para o citoplasma com auxílio da exportina 5, onde sofre diversas modificações e maturações que são mediadas pela endoribonuclease Dicer. A dupla fita de RNA gerada pela Dicer se acopla com proteínas da família argonauta (AGO), formando o complexo denominado RISC ou miRISC que é então responsável pelo silenciamento dos RNAs (ROITBAK, 2019).

A relação dos miRNAs com o SNC destaca-se tanto no período de desenvolvimento, influenciando os processos de diferenciação celular, proliferação e sinaptogênese, quanto servindo de biomarcador para doenças neurodegenerativas. Os miRNAs são portanto fatores chave na modulação e desenvolvimento da resposta imune, podendo ser considerados como pró-inflamatórios (miRNA-155, miRNA-27b, miRNA-326) ou anti-inflamatórios (miRNA-124, miRNA-146a, miRNA-21, miRNA-223) (CHEN et al., 2019; GHARIBI et al., 2019; PONNUSAMY; YIP, 2019).

O miR-155 é um miRNA pró-inflamatório que vem sendo amplamente estudado. Sua primeira menção em um processo inflamatório foi em 2005, na qual reportaram sua importância na função dos linfócitos B e na produção de citocinas. Em macrófagos, sua transcrição é aumentada a partir de ligantes de TLR e citocinas pró-inflamatórias como o IFN γ (O'CONNELL et al., 2007). Os principais alvos do miR-155 são o fator de transcrição C/EBP- β , o fosfato de inositol *Ship1*, o supressor da STAT1 – *Socs1* e o receptor anti-inflamatório IL13Ra-1. Desta forma, o aumento da transcrição do miR-155 está relacionado com uma queda da resposta anti-inflamatória culminando no aumento da inflamação (GAUDET et al., 2018).

O grupo de WANG et al. (2014) mostrou que a exposição à fumaça do cigarro é capaz de aumentar a expressão do miR-155 no modelo de arterosclerose, o que corrobora os nossos dados. As alterações do miR-155 já foram descritas em diversas doenças neurodegenerativas, como por exemplo a Esclerose Lateral Amiotrófica, Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e na Esclerose Múltipla. O'CONNELL et al. (2010), mostraram que a inibição ou deleção do miR-155 no modelo murinho da EAE é neuroprotetora, uma vez que a ativação de células T auxiliares (*helpers*) e citotóxicas, bem como a produção e liberação de citocinas está diminuída.

Nos astrócitos o miR-155 está aumentado após estímulo com LPS e IFN γ , demonstrando um componente importante na astrogliose derivada de um estímulo inflamatório (MOR et al., 2011). Já nas células da microglia o miRNA-155 é descrito como um fator importante na polarização para perfil M1, uma vez que ele é capaz de bloquear C/EBP- β , levando a uma diminuição da produção de IL-10. Além disso, ao bloquear *Ship1*, há inibição da formação de PIP3 (fosfato de 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol), com consequente diminuição da ativação de AKT (proteína quinase B), culminado em maior atividade do NF- κ B e iNOS (VERGADI et al., 2017).

Outro miRNA alterado em condições neuroinflamatórias é o miR-146a, dotado de uma função anti-inflamatória, este miRNA possui sua transcrição aumentada após ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B e exerce sua função ao diminuir a sinalização de TLR, além da sinalização por citocinas por meio de *feedback* negativo que envolve a diminuição do receptor de IL-1 associado a quinase 1 (IRAK1) e do receptor de TNF associado ao fator 6 (TRAF6) (GHARIBI et al., 2019). Quando expresso em células endoteliais da BHE, o miR-146a é responsável pela diminuição da ativação do NF- κ B e da adesão de linfócitos T, limitando a infiltração celular e consequentemente a neuroinflamação no decurso da doença (GAUDET et al., 2018).

Outro miRNA que merece destaque em sua ação anti-inflamatória é o miR-223. Descrito principalmente por sua ação periférica, o miR-223 é capaz de desencadear uma resposta tipicamente M2 nos macrófagos, além de diminuir a sinalização em neutrófilos e células dendríticas (LI et al., 2017). A função do miR-223 ainda é pouco estudada em processos neuroinflamatórios, sabe-se que este miRNA reduz a neurotoxicidade após a isquemia por aumentar a degradação do mRNA responsável pela transcrição dos receptores de glutamato (HARRAZ et al., 2012). Na EAE foi observado que a deleção do miR-223 melhora as funções neurológicas por reduzir a

ativação de linfócitos TH17 pelas células dendríticas, melhorando a atividade de células supressoras (CANTONI et al., 2017).

De maneira geral, nosso trabalho mostra que a exposição durante o período gestacional altera a resposta imune da prole, há uma maior polarização das células da microglia para o subtipo M1, com aumento da liberação de citocinas e NO, que acaba gerando a morte celular em culturas enriquecidas de neurônio. Estas alterações são persistentes, uma vez que observamos que os animais expostos à fumaça do cigarro durante a gestação desenvolveram uma EAE com maior grau de doença, maior infiltrado celular e desmielinização. Estes fatos podem ser decorrentes do aumento do miRNA-155 nas células da microglia e astrócitos. Sendo assim, podemos sugerir que a exposição à fumaça do cigarro durante a gestação de camundongos leva a uma programação fetal duradoura e que repercute de forma importante nos fenômenos biológicos da prole na vida adulta.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

A exposição de camundongos fêmeas prenhes à fumaça do cigarro leva a uma programação fetal nas células da glia com aumento da resposta neuroinflamatória frente a um estímulo sistêmico.

De acordo com nossos resultados, podemos destacar que as alterações causadas pela exposição gestacional à fumaça do cigarro quando desafiada com LPS são:

- ✓ Aumento a transcrição de genes pró-inflamatórios “in vivo”
- ✓ Polarização das células da microglia para o fenótipo M1
- ✓ Aumento da liberação de citocinas como IL-6 e TNF α no SNC
- ✓ Aumento da produção e liberação de NO no SNC
- ✓ Aumento da morte celular por apoptose sob responsabilidade das células da microglia
- ✓ Aumento da expressão do miRNA-155
- ✓ Maior grau de encefalomielite autoimune experimental com aumento de infiltrado celular e desmielinização

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-GUBORY, K. H. Environmental pollutants and lifestyle factors induce oxidative stress and poor prenatal development. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 29, n. 1, p. 17–31, 2014.

ALAVANJA, M. et al. Tobacco smoke and involuntary smoking. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v. 83, p. 1–1413, 2004.

ALLEN, N. J. Astrocyte regulation of synaptic behavior. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 30, p. 439–63, 2014.

ALROUJI, M. et al. Effects of cigarette smoke on immunity, neuroinflammation and multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, n. September, 2018.

ANDRIOLI, T. C. **Exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal: predisposição à dependência de drogas de abuso na adolescência**. **Exposição à fumaça do cigarro no início do período pós-natal: predisposição à dependência de drogas de abuso na adolescência**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.

ARESTI SANZ, J.; EL AIDY, S. Microbiota and gut neuropeptides: a dual action of antimicrobial activity and neuroimmune response. **Psychopharmacology**, 17 abr. 2019.

BAILEY, S. L. et al. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides “preferentially” polarize CD4+TH-17 cells in relapsing EAE. **Nature Immunology**, v. 8, n. 2, p. 172–180, 2007.

BALDWIN, K. T.; EROGLU, C. ScienceDirect Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 45, p. 113–120, 2017.

BARLOW, B. K. et al. The gestational environment and Parkinson’s disease: Evidence for neurodevelopmental origins of a neurodegenerative disorder. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 3, p. 457–470, 2007.

BENOWITZ, N. L. et al. Nicotine metabolite ratio as a predictor of cigarette consumption. **Nicotine and Tobacco Research**, v. 5, n. 5, p. 621–624, 2003.

BENOWITZ, N. L.; JACOB, P. Trans-3-hydroxycotinine: Disposition kinetics, effects and plasma levels during cigarette smoking. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 51, n. 1, p. 53–59, 2001.

BEUTLER, E.; WEST, C. Simplified determination of carboxyhemoglobin. **Clinical chemistry**, v. 30, n. 6, p. 871–4, jun. 1984.

BIALAS, A. R.; STEVENS, B. TGF- β signaling regulates neuronal C1q

expression and developmental synaptic refinement. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 12, p. 1773–1782, 27 dez. 2013.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396–8, 2007.

BLOM, H. J. et al. Neural tube defects and folate: Case far from closed. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 724–731, 2006.

BOSE, S.; CHO, J. Role of chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in neurodegenerative diseases. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 9, p. 1039–1050, 2013.

BRAMBILLA, R. et al. Inhibition of astroglial nuclear factor κ B reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 1, p. 145–156, 2005.

BRANDÃO, W. N. **GLUTAMATO ATRAVÉS DA SINALIZAÇÃO PELO NMDAR MODULA A RESPOSTA INATA DE CÉLULAS IMUNITÁRIAS IN VITRO DURANTE HIPÓXIA**. [s.l.: s.n.].

BREILING, A.; LYKO, F. Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. **Epigenetics & Chromatin**, v. 8, n. 1, p. 24, 2015.

BREITLING, L. P. et al. Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27K discovery and replication. **American Journal of Human Genetics**, v. 88, n. 4, p. 450–457, 2011.

BRONNER, G. et al. Female sexuality in multiple sclerosis: The multidimensional nature of the problem and the intervention. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 121, n. 5, p. 289–301, 2010.

BRONSTEIN, R. et al. Culturing Microglia from the Neonatal and Adult Central Nervous System. **Journal of Visualized Experiments**, n. August, p. 1–6, 2013.

BRUTTGER, J. et al. Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. **Immunity**, v. 43, n. 1, p. 92–106, 2015.

CAHOY, J. D. et al. A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 264–278, 2 jan. 2008.

CANTONI, C. et al. Mir-223 regulates the number and function of myeloid-derived suppressor cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Acta Neuropathologica**, v. 133, n. 1, p. 61–77, 2017.

CEKANAVICIUTE, E.; BUCKWALTER, M. S. Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. **Neurotherapeutics**, 27 set. 2016.

CHEN, H. et al. Cigarette smoke exposure reprograms the hypothalamic

neuropeptide Y axis to promote weight loss. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 173, n. 11, p. 1248–1254, 2006.

CHEN, L. et al. MicroRNA-146a protects against cognitive decline induced by surgical trauma by suppressing hippocampal neuroinflammation in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, n. August 2018, 2019.

CHISTYAKOV, V. et al. Nicotine exposure throughout early development promotes nicotine self-administration in adolescent mice and induces long-lasting behavioural changes. **European Journal of Pharmacology**, v. 640, n. 1–3, p. 87–93, 2010.

COLOMBO, E.; FARINA, C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 9, p. 608–620, 2016.

CONDUCTIER, G. et al. The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. **Journal of Neuroimmunology**, v. 224, n. 1–2, p. 93–100, 2010.

CUNNINGHAM, C. Microglia and neurodegeneration: The role of systemic inflammation. **GLIA**, v. 61, n. 1, 2013.

DAHL, C.; GRONBAEK, K.; GULDBERG, P. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 11–12, p. 831–836, 2011.

DEMPSEY, D. et al. Nicotine metabolite ratio as an index of cytochrome P450 2A6 metabolic activity. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 76, n. 1, p. 64–72, 2004.

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 136–153, 2016.

DOI, A. et al. Differential methylation of tissue-and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. **Nature genetics**, v. 41, n. 12, p. 1350–1353, 2009.

DUARTE, J. L. et al. Efeitos da inalação passiva da fumaça de cigarro sobre as pregas vocais de ratos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologista**, v. 72, n. 2, p. 210–216, 2006.

DURÃO, A. C. **Efeito da fumaça do cigarro no sistema nervoso central em um modelo de inflamação sistêmica**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2014.

EWING, M. M. et al. T-cell co-stimulation by CD28-CD80/86 and its negative regulator CTLA-4 strongly influence accelerated atherosclerosis development. **International Journal of Cardiology**, v. 168, n. 3, p. 1965–1974, 2013.

EYO, U. B.; DAILEY, M. E. Microglia: Key Elements in Neural Development, Plasticity, and Pathology. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 8, n. 3, p.

494–509, 27 jun. 2013.

FAA, G. et al. Fetal programming of neuropsychiatric disorders. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 108, n. 3, p. 207–223, 2016.

FARINA, C. et al. Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 159, n. 1–2, p. 12–19, 2005.

FRIESE, M. A. et al. The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. **Brain**, v. 129, n. 8, p. 1940–1952, 2006.

GATZKE-KOPP, L. M. et al. Magnitude and Chronicity of Environmental Smoke Exposure Across Infancy and Early Childhood in a Sample of Low-Income Children. **Nicotine & Tobacco Research**, p. 1–8, 2018.

GAUDET, A. D. et al. MicroRNAs: Roles in Regulating Neuroinflammation. **Neuroscientist**, v. 24, n. 3, p. 221–245, 2018.

GHARIBI, S. et al. Altered expression patterns of complement factor H and miR-146a genes in acute-chronic phases in experimental autoimmune encephalomyelitis mouse. **Journal of Cellular Physiology**, n. March, p. jcp.28583, 2019.

GINHOUX, F. et al. Origin and differentiation of microglia. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, n. April, p. 45, 2013.

GODDING, V. et al. Does In Utero Exposure to Heavy Maternal Smoking Induce Nicotine Withdrawal Symptoms in Neonates? **Pediatric Research**, v. 55, n. 4, p. 645–651, 2004.

GOLDSTEIN, D. S.; KOPIN, I. J. Evolution of concepts of stress. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 10, n. 2, p. 109–20, 2007.

GOVERMAN, J.; PERCHELLET, A.; HUSEBY, E. S. The role of CD8(+) T cells in multiple sclerosis and its animal models. **Current drug targets. Inflammation and allergy**, v. 4, n. 2, p. 239–45, 2005.

HAMI, J. et al. Synaptogenesis in the Cerebellum of Offspring Born to Diabetic Mothers. **journal of pediatric Neurosciences**, v. 12, n. 3, p. 215–221, 2018.

HARRAZ, M. M. et al. MicroRNA-223 is neuroprotective by targeting glutamate receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 46, p. 18962–18967, 2012.

HARRY, G. J.; KRAFT, A. D. NeuroToxicology Microglia in the developing brain : A potential target with lifetime effects. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 2, p. 191–206, 2012.

HAUG, N. A.; HEINBERG, L. J.; GUARDA, A. S. Cigarette smoking and its relationship to other substance use among eating disordered inpatients1. **Eating and Weight Disorders**, v. 6, n. 3, p. 130–139, 2001.

HSIEH, C. et al. Systemic Lipopolysaccharide-Induced Pain Sensitivity and

Spinal Inflammation Were Reduced by Minocycline in Neonatal Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2947, p. 1–16, 2018.

INCA, I. N. D. C. **Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco**. [s.l: s.n.].

INGLE, J. I.; BAKLAND, L. K.; SCOTT, J. **The Tobacco Atlas**. Fifth Edit ed. [s.l.] American Cancer Society, Inc, 2015.

IRIZARRY, A. R. Genome-wide methylation analysis of human colon cancer reveals similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue- specific CpG island shores. **Nature genetics**, v. 41, n. 2, p. 178–186, 2009.

IVORRA, C. et al. DNA methylation patterns in newborns exposed to tobacco in utero. **Journal of translational medicine**, v. 13, n. 1, p. 25, 2015.

JADAVJI, N. M. et al. MTHFR deficiency or reduced intake of folate or choline in pregnant mice results in impaired short-term memory and increased apoptosis in the hippocampus of wild-type offspring. **Neuroscience**, v. 300, p. 1–9, 2015.

JAFARI, N.; HINTZEN, R. Q. The association between cigarette smoking and multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 311, n. 1–2, p. 78–85, 2011.

JARVIS, M. J. et al. Assessing smoking status in children, adolescents and adults: Cotinine cut-points revisited. **Addiction**, v. 103, n. 9, p. 1553–1561, 2008.

JENSEN, T. K. et al. Adult and Prenatal Exposures to Tobacco Smoke as Risk Indicators of Fertility among 430 Danish Couples. **American Journal of Epidemiology**, v. 148, n. 10, p. 992–997, 1998.

JIANG, H. et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1a via nuclear factor-kB in rats with chronic obstructive pulmonary disease. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 42, n. 7, p. 483–488, 2010.

JOSEPH, A. et al. Biomarker evidence of tobacco smoke exposure in children participating in lead screening. **American Journal of Public Health**, v. 103, n. 12, p. 54–59, 2013.

KARAOGLU, A. et al. Effects of maternal smoking on fetal organs. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 21, n. 4, p. 441–446, 2012.

KHANNA, A. et al. Inflammation and oxidative stress induced by cigarette smoke in Lewis rat brains. **Journal of Neuroimmunology**, v. 254, n. 1–2, p. 69–75, 2013.

KIM, S. Y. et al. Blood-brain barrier dysfunction-induced inflammatory signaling in brain pathology and epileptogenesis. **Epilepsia**, v. 53 Suppl 6, n. II, p. 37–44, 2012.

KRAFT, A. D.; HARRY, G. J. Features of Microglia and Neuroinflammation Relevant to Environmental Exposure and Neurotoxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 12, p. 2980–3018, 20 jul. 2011.

KROEFF, L. R. et al. Correlates of smoking in pregnant women in six Brazilian cities. **Revista de saude publica**, v. 38, n. 2, p. 261–267, 2004.

LEE, B.-E. et al. Secondhand smoke exposure during pregnancy and infantile neurodevelopment. **Environmental research**, v. 111, n. 4, p. 539–44, 2011.

LEE, K. W. K.; PAUSOVA, Z. Cigarette smoking and DNA methylation. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. JUL, p. 1–11, 2013.

LEE, M. Neurotransmitters and Microglial-Mediated Neuroinflammation. **Current Protein & Peptide Science**, v. 14, n. 1, p. 21–32, 1 mar. 2013.

LI, M. et al. MicroRNA-223 ameliorates alcoholic liver injury by inhibiting the IL-6-p47 phox -oxidative stress pathway in neutrophils. **Gut**, v. 66, n. 4, p. 705–715, 2017.

LIDDELOW, S. A. et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature**, v. 541, n. 7638, p. 481–487, 2017.

LIN, Q. et al. Prenatal exposure to environmental tobacco smoke and hyperactivity behavior in Chinese young children. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 10, 2017.

LIU, G. et al. Restraint stress alters immune parameters and induces oxidative stress in the mouse uterus during embryo implantation. **Stress**, v. 17, n. 6, p. 494–503, 2014a.

LIU, G. et al. Restraint stress delays endometrial adaptive remodeling during mouse embryo implantation. **Stress**, v. 18, n. 6, p. 699–709, 2015.

LIU, Y.-C. et al. Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 5, p. 520–529, 2014b.

LOBO TORRES, L. H. et al. Environmental tobacco smoke induces oxidative stress in distinct brain regions of infant mice. **Journal of toxicology and environmental health. Part A**, v. 75, n. 16–17, p. 971–80, 2012.

LOCKMAN, P. R. et al. Brain Uptake Kinetics of Nicotine and Cotinine after Chronic Nicotine Exposure. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, n. 2, p. 636–642, 2005.

LOUVEAU, A. et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. **Nature**, v. 523, 2015.

LOUVEAU, A.; HARRIS, T. H.; KIPNIS, J. Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 10, p. 569–577, 2015.

LYALL, K.; SCHMIDT, R. J.; HERTZ-PICCIOTTO, I. Maternal lifestyle and environmental risk factors for autism spectrum disorders. **International Journal of Epidemiology**, v. 43, n. 2, p. 443–464, 2014.

LYMAN, M. et al. Neuroinflammation: The role and consequences.

Neuroscience Research, v. 79, n. 1, p. 1–12, 2014a.

LYMAN, M. et al. Neuroinflammation: The role and consequences. **Neuroscience Research**, v. 79, n. 1, p. 1–12, 2014b.

MACHT, V. A. Neuro-immune interactions across development: A look at glutamate in the prefrontal cortex. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 71, p. 267–280, 2016.

MAGGIO, R. et al. Nicotine Prevents Experimental Parkinsonism in Rodents and Induces Striatal Increase of Neurotrophic Factors. **Journal of neurochemistry**, v. 71, p. 2439–2446, 1998.

MALHEIRO, A. **Determinação espectrofotométrica da carboxihemoglobina em indivíduos expostos ocupacionalmente ao monóxido de carbono.** [s.l: s.n.].

MAN, C. N. et al. Simple, rapid and sensitive assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 844, n. 2, p. 322–7, 2006.

MATT, G. E. et al. Evaluation of urinary trans-3'-hydroxycotinine as a biomarker of children's environmental tobacco smoke exposure. **Biomarkers**, v. 11, n. 6, p. 507–523, 2006.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. July, 2008.

MELLO, P. R. B.; PINTO, G. R. DE; BOTELHO, C. Influência do tabagismo na fertilidade , gestação e lactação. **Jornal de Pediatria**, v. 77, n. 4, p. 257–264, 2001.

MESQUITA, S. DA; FU, Z.; KIPNIS, J. Perspective The Meningeal Lymphatic System : A New Player in Neurophysiology. **Neuron**, v. 100, n. 2, p. 375–388, 2018.

MONICK, M. M. et al. Coordinated changes in AHRR methylation in lymphoblasts and pulmonary macrophages from smokers. **American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 159 B, n. 2, p. 141–151, 2012.

MOR, E. et al. Species-specific microRNA roles elucidated following astrocyte activation. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 9, p. 3710–3723, 2011.

MORMILE, R. et al. Cigarette smoke exposure in utero and impact on neurological development: A knockdown of the expression of Hox-genes? **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 288, n. 2, p. 455–456, 2013.

MUKHOPADHYAY, P. et al. Prenatal exposure to environmental tobacco smoke alters gene expression in the developing murine hippocampus. **Reproductive Toxicology**, v. 29, n. 2, p. 164–175, 2010.

MULLER, M. et al. Current Theories for Multiple Sclerosis Pathogenesis and Treatment. **Autoimmune Diseases - Contributing Factors, Specific Cases of**

Autoimmune Diseases, and Stem Cell and Other Therapies, p. 3–24, 2012.

MUND, M. et al. Smoking and pregnancy - A review on the first major environmental risk factor of the unborn. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 12, p. 6485–6499, 2013.

NEAL, M.; RICHARDSON, J. R. Epigenetic regulation of astrocyte function in neuroinflammation and neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 2, p. 432–443, 2018.

NG, S. P. et al. Effects of prenatal exposure to cigarette smoke on offspring tumor susceptibility and associated immune mechanisms. **Toxicological Sciences**, v. 89, n. 1, p. 135–144, 2006.

NG, S. P. et al. Prenatal exposure to cigarette smoke alters later-life antitumor cytotoxic T-lymphocyte (CTL) activity via possible changes in T-regulatory cells. **Journal of toxicology and environmental health. Part A**, v. 76, n. 19, p. 1096–1110, 2013.

O'CONNELL, R. M. et al. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 5, p. 1604–1609, 2007.

O'CONNELL, R. M. et al. MicroRNA-155 promotes autoimmune inflammation by enhancing inflammatory T cell development. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 607–619, 2010.

O'RAHILLY, R.; MLLER, F. **The Embryonic Human Brain**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006.

OBOT, C. et al. Characterization of mainstream cigarette smoke-induced biomarker responses in ICR and C57Bl/6 mice. **Inhalation toxicology**, v. 16, n. 10, p. 701–719, 2004.

OLIVEIRA, A. A. F. DE et al. Sustained kidney biochemical derangement in treated experimental diabetes: a clue to metabolic memory. **Scientific Reports**, n. January, p. 1–15, 2017.

OMS, W. H. O. **WHO report on the global tobacco epidemic: Raising taxes on tobacco**. World Health Organization. **Anais...2015**Disponível em: <www.who.int/tobacco>

OPAS, O. P.-A. DE S. **Ambiente 100% Livres de Tabaco - Guia para elaboração e implantação de políticas públicas**. 2008

PAOLICELLI, R. C. et al. Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. **Science**, v. 333, n. 6048, p. 1456–1458, 9 set. 2011.

PEKNY, M. et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 3, p. 323–345, 2016.

PERON, J. P. S. et al. Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall

inflammation in the central nervous system of EAE mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 227, n. 1–2, p. 10–17, 2010.

PETZOLDT, A. G.; SIGRIST, S. J. Synaptogenesis. **Current Biology**, v. 24, n. 22, p. R1076–R1080, 2014.

PIRAS, M. et al. Fetal programming of Parkinson's and Alzheimer's diseases: the role of epigenetic factors. **Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine**, v. 3, n. 2, p. 1–11, 2014.

PONNUSAMY, V.; YIP, P. K. The role of microRNAs in newborn brain development and hypoxic ischaemic encephalopathy. **Neuropharmacology**, v. 149, n. August 2018, p. 55–65, 2019.

PONOMAREV, E. D. et al. Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. **Journal of Neuroscience Research**, v. 81, n. 3, p. 374–389, 2005.

PRESCOTT, S. L. Effects of early cigarette smoke exposure on early immune development and respiratory disease. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 9, n. 1, p. 3–10, 2008.

PRINZ, M.; PRILLER, J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. **Nature Publishing Group**, v. 15, n. 5, p. 300–312, 2014.

RACKE, M. K.; HU, W.; LOVETT-RACKE, A. E. PTX cruiser: Driving autoimmunity via TLR4. **Trends in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 289–291, 2005.

RANSOHOFF, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 168–175, 2016.

RICE, D.; JR, S. B. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. **Environmental Health Perspectives Supplements**, v. 108, n. April, p. 1–71, 2010.

ROCHA, N. P.; DE MIRANDA, A. S.; TEIXEIRA, A. L. Insights into neuroinflammation in Parkinson's disease: From biomarkers to anti-inflammatory based therapies. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

ROITBAK, T. MicroRNAs and Regeneration in Animal Models of CNS Disorders. **Neurochemical Research**, v. 0, n. 0, p. 0, 2019.

ROSTÈNE, W. et al. Neurochemokines: A menage a trois providing new insights on the functions of chemokines in the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 118, n. 5, p. 680–694, 2011.

SALMÓRIA, J. G.; OLIVEIRA, B. R. G. Crianças de centros de educação infantil: exposição ao fumo passivo. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 5, n. 1, p. 016–023, 2008.

SAURA, J.; TUSELL, J. M.; SERRATOSA, J. High-Yield Isolation of Murine

Microglia by Mild Trypsinization. **Glia**, v. 44, n. 3, p. 183–189, 2003.

SHABAB, T. et al. Neuroinflammation pathways: a general review. **International Journal of Neuroscience**, v. 127, n. 7, p. 624–633, 2017.

SHEMER, A. et al. Microglia Plasticity During Health and Disease: An Immunological Perspective. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 10, p. 614–624, 2015.

SHENKER, N. S. et al. DNA methylation as a long-term biomarker of exposure to tobacco smoke. **Epidemiology (Cambridge, Mass.)**, v. 24, n. 5, p. 712–6, 2013.

SILBEREIS, J. C. et al. Review The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System. **Neuron**, v. 89, n. 2, p. 248–268, 2015.

SINGH, S. P. et al. Prenatal secondhand cigarette smoke promotes Th2 polarization and impairs goblet cell differentiation and airway mucus formation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 187, n. 9, p. 4542–52, 2011.

SOELLNER, I. A. et al. Differential aspects of immune cell infiltration and neurodegeneration in acute and relapse experimental autoimmune encephalomyelitis. **Clinical Immunology**, v. 149, n. PB, p. 519–529, 2013.

SOFRONIEW, M. V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 5, p. 249–263, 2015.

STREIT, W. J.; MRAK, R. E.; GRIFFIN, W. S. T. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. **Journal of Neuroinflammation**, v. 1, n. 1, p. 14, 2004.

SUZUMURA, A. Neuron-Microglia Interaction in Neuroinflammation. **Current Protein & Peptide Science**, v. 14, n. 1, p. 16–20, 1 mar. 2013.

TANNER, J. A. et al. Nicotine metabolite ratio (3-Hydroxycotinine/Cotinine) in plasma and urine by different analytical methods and laboratories: Implications for clinical implementation. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 24, n. 8, p. 1239–1246, 2015.

THATCHER, T. H. et al. High-dose but not low-dose mainstream cigarette smoke suppresses allergic airway inflammation by inhibiting T cell function. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 295, n. 3, p. L412–L421, 2008.

TIZABI, Y. et al. Hyperactivity induced by prenatal nicotine exposure is associated with an increase in cortical nicotinic receptors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 58, n. 1, p. 141–146, 1997.

TOLEDO-RODRIGUEZ, M. et al. Maternal smoking during pregnancy is associated with epigenetic modifications of the brain-derived neurotrophic factor-6 exon in adolescent offspring. **American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 153, n. 7, p. 1350–1354, 2010.

TORRES-PACHECO, L. H. L. **Avaliação do desenvolvimento do sistema nervoso central de camundongos Balb/c expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal.** [s.l: s.n.].

TORRES, L. H. et al. Environmental tobacco smoke in the early postnatal period induces impairment in brain myelination. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 11, p. 2051–2058, 2015a.

TORRES, L. H. et al. Exposure of neonatal mice to tobacco smoke disturbs synaptic proteins and spatial learning and memory from late infancy to early adulthood. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–21, 2015b.

TUTKA, P.; MOSIEWICZ, J.; WIELOSZ, M. Pharmacokinetics and metabolism of nicotine. **Pharmacological Reports**, v. 57, n. 2, p. 143–153, 2005.

VARATHARAJ, A.; GALEA, I. The blood-brain barrier in systemic inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2016.

VERGADI, E. et al. Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 3, p. 1006–1014, 2017.

VON BERNHARDI, R.; EUGENÍN-VON BERNHARDI, L.; EUGENÍN, J. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 7, n. JUN, p. 1–21, 2015.

WANG, J. et al. MicroRNA-155 induction by Mycobacterium bovis BCG enhances ROS production through targeting SHIP1. **Molecular Immunology**, v. 62, n. 1, p. 29–36, 2014.

WANG, Q.; LIU, Y.; ZHOU, J. Neuroinflammation in Parkinson ' s disease and its potential as therapeutic target. **Translational Neurodegeneration**, p. 1–9, 2015.

WIENCEK, J. R. et al. Detection of Nicotine and Nicotine Metabolites in Units of Banked Blood. **American Journal of Clinical Pathology**, p. 1–6, 3 fev. 2019.

WINGERCHUK, D. M. Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. **Therapeutic advances in neurological disorders**, v. 5, n. 1, p. 13–22, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Report on the Global Tobacco Epidemic,2017.** [s.l: s.n.].

XIAO, B. G.; LINK, H. Is there a balance between microglia and astrocytes in regulating Th1/Th2-cell responses and neuropathologies? **Immunology Today**, v. 20, n. 11, p. 477–479, 1999.

YAMADA, S. et al. Developmental atlas of the early first trimester human embryo. **Developmental Dynamics**, v. 239, n. 6, p. 1585–1595, 2010.

YONG, V. W. et al. Minocycline and neurological diseases The promise of minocycline in neurology. **the Lancet Neurology**, v. 3, n. December, p. 744–751,

2004.

ZAMANIAN, J. L. et al. Genomic Analysis of Reactive Astroglia. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 18, p. 6391–6410, 2012.

ZARJEVSKI, N. et al. Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. **Endocrinology**, v. 133, n. 4, p. 1753–1758, out. 1993.

ZIV, Y. et al. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 2, p. 268–275, 2006.

Anexos

8. ANEXOS

8.1. Ficha do Aluno

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 26/09/2014
Prorrogação em 17/07/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Prorrogação em 17/07/2018

Impresso em: 08/10/2018 15:33:26

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9143 - 7913856/1 - Ana Carolina Cardoso dos Santos Durão

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5784-3/6	Tópicos Avançados em Toxicologia II	03/03/2015	16/06/2015	15	1	90	A	N	Concluída
EDM5791-7/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	10/03/2015	20/04/2015	60	4	100	A	N	Concluída
BMB5824-1/2	RNA em suas Múltiplas Funções (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/08/2015	12/10/2015	120	8	85	B	N	Concluída
QBQ5769-4/1	Vias Moleculares de Reparo de DNA (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	11/08/2015	07/09/2015	60	4	89	B	N	Concluída
BMF5868-2/3	Neuroinflamação e as Doenças Neurodegenerativas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/05/2016	06/06/2016	120	8	85	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	25
Estágios:			
Total:	0	20	25

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Prorrogação em 17/07/2018

Impresso em: 08/10/2018 15:33:27

8.2. Lattes

<http://lattes.cnpq.br/5488121550848993>

8.3. Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

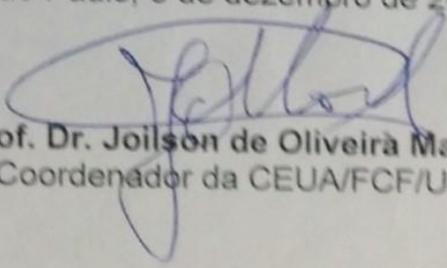
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 120.2014-P486

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "Efeitos da fumaça do cigarro na biologia das células da microglia e astrócitos e suas implicações na neuroinflamação" (Protocolo CEUA/FCF/486), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Ana Carolina Cardoso dos Santos Durão**, sob orientação do(a) **Profa. Dra. Tania Marcourakis**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **5 de dezembro de 2014**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 8 de dezembro de 2014.


Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 27.2017-P486

São Paulo, 9 de maio de 2017.

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): **Ana Carolina Cardoso dos Santos Durão**
FBC/FCF/USP

Assunto: **aprovação de alteração do Protocolo CEUA nº 486.**

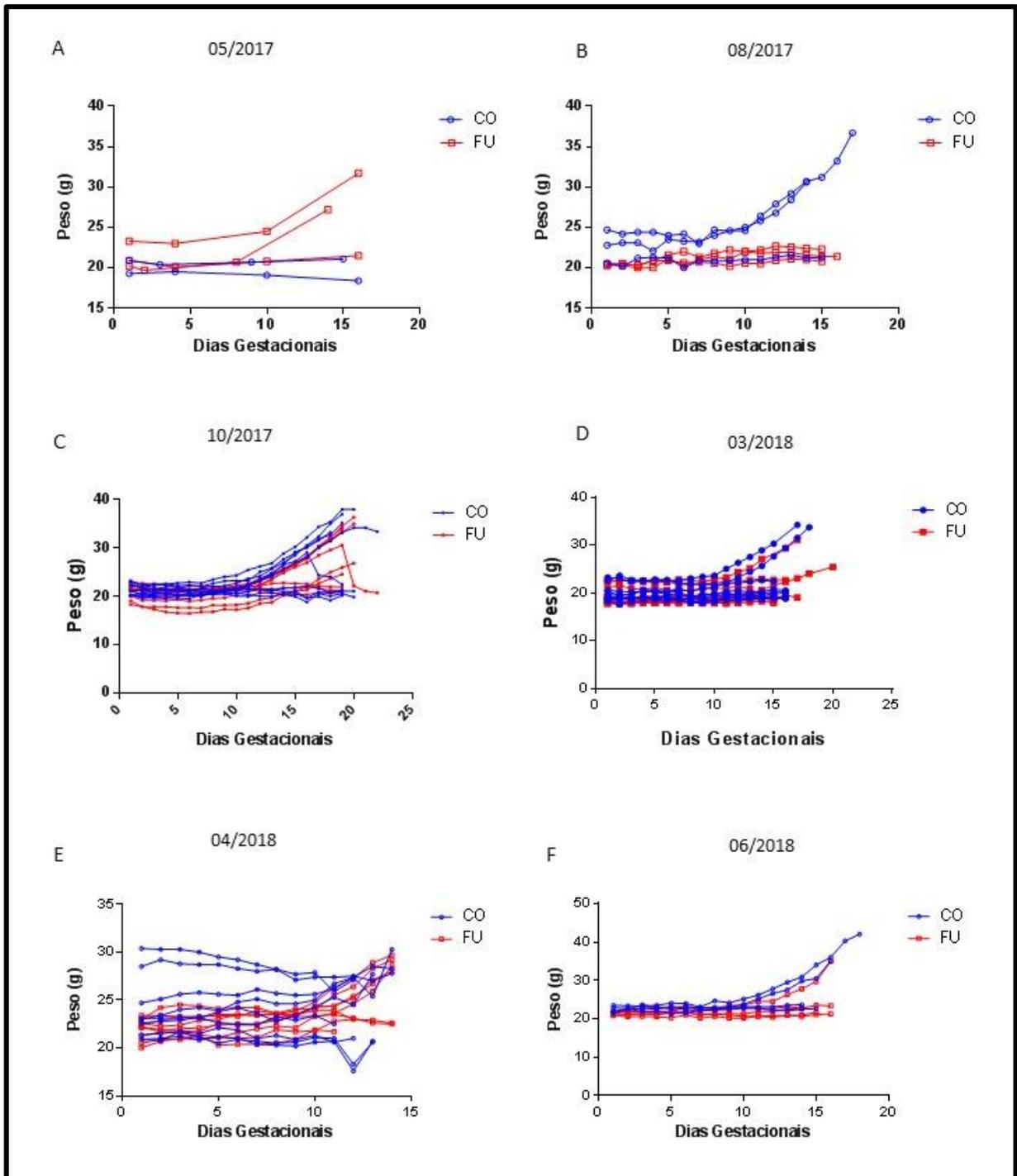
Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), em reunião realizada em 5 de maio de 2017, **APROVOU** as alterações propostas para o projeto de pesquisa "**Efeitos da fumaça do cigarro na biologia das células da microglia e astrócitos e suas implicações na neuroinflamação**" (Protocolo CEUA nº 486), conforme constante nos documentos apresentados (solicitação de 72 camundongos C57BL/6).

Cordialmente,


Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

8.4. Peso Fêmeas



8.5. PCR

Assay ID	1	2	3	4	5	6
A	Hs99999901_s1	Mm99999915_g1	Mm00446968_m1	Mm00446953_m1	Mm00431727_g1	Mm00432050_m1
B	Mm01302428_m1	Mm99999051_gH	Mm00438271_m1	Mm00432608_m1	Mm00515420_m1	Mm00483137_m1
C	Mm00839636_g1	Mm00711660_m1	Mm00444543_m1	Mm01182107_g1	Mm00432688_m1	Mm00438328_m1
D	Mm00484152_m1	Mm00438656_m1	Mm00433237_m1	Mm00438864_m1	Mm01256734_m1	Mm00442834_m1
E	Mm00439616_m1	Mm00434165_m1	Mm01288992_m1	Mm00434204_m1	Mm00434210_m1	Mm00439619_m1
F	Mm00445259_m1	Mm00439646_m1	Mm00446190_m1	Mm00434291_m1	Mm00434305_m1	Mm01328172_g1
G	Mm00448463_m1	Mm00441278_m1	Mm00441295_m1	Mm00448744_m1	Mm00489637_m1	Mm00484741_m1
H	Mm00450960_m1	Mm00441724_m1	Mm00443258_m1	Mm00437136_m1	Mm00449197_m1	Mm00437304_m1

Assay ID	7	8	9	10	11	12
A	Mm00477631_m1	Mm00437783_m1	Mm00437858_m1	Mm00839967_g1	Mm00441242_m1	Mm00441258_m1
B	Mm00519283_m1	Mm00483146_m1	Mm00599683_m1	Mm00442754_m1	Mm00441895_m1	Mm00441911_m1
C	Mm00438334_m1	Mm00486849_m1	Mm00445235_m1	Mm00444662_m1	Mm00438259_m1	Mm00487224_m1
D	Mm00772352_m1	Mm00439221_m1	Mm00516004_m1	Mm00497600_m1	Mm00801778_m1	Mm00833995_m1
E	Mm00434225_m1	Mm00439620_m1	Mm00434228_m1	Mm00434256_m1	Mm00434261_m1	Mm00439631_m1
F	Mm00440227_m1	Mm00476361_m1	Mm00479807_m1	Mm00440485_m1	Mm00812512_m1	Mm00478374_m1
G	Mm00782550_s1	Mm00850544_g1	Mm00439518_m1	Mm00456961_m1	Mm00448890_m1	Mm01160477_m1
H	Mm00802048_m1	Mm00516023_m1	Mm00434761_m1	Mm00444223_m1	Mm01249194_m1	Mm00452375_m1

Gene Symbol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S	Gapdh	Hprt1	Gusb	Agtr2	Bax	Bcl2	Bcl2l1	C3	Ccl19	Ccl2	Ccl3
B	Ccl5	Ccr2	Ccr4	Ccr7	Cd19	Cd28	Cd34	Cd38	Cd3e	Cd4	Cd40	Cd40lg
C	Cd68	Cd80	Cd86	Cd8a	Csf1	Csf2	Csf3	Ctla4	Cxcl10	Cxcl11	Cxcr3	Cyp1a2
D	Cyp7a1	Edn1	Fas	Fasl	Fn1	Gzmb	H2-Ea	H2-Eb1	Hmox1	Icos	Ifng	Ikbkb
E	Il10	Il12a	Il12b	Il13	Il15	Il17a	Il18	Il1a	Il1b	Il2	Il2ra	Il3
F	ORC3L	Il5	Il6	Il7	Il9	Lrp2	Lta	Nfkb1	Nfkb2	Nos2	Prf1	Ptgs2
G	Ptprc	Sele	Selp	Ski	Smad3	Smad7	Socs1	Socs2	Stat1	Stat3	Stat4	Stat6
H	Tbx21	Tgfb1	Tnf	Tnfrsf18	Vcam1	Vegfa	Ace	Icam1	Lif	Ly96	Nfatc3	Nfatc4

Genes Over -Expressed in				
Group 1 (FU) vs. Control Group				
Position	Gene Symbol	Fold Regulation	Comments	RT2 Catalog
B01	Ccl5	2,1094	B	PPH05666E

Genes Under -Expressed in				
Group 1 (FU) vs. Control Group				
Position	Gene Symbol	Fold Regulation	Comments	RT2 Catalog
B02	Ccr2	-3,3694	A	PPH00073G
G07	Socs1	-2,5263	A	PPH01018C
H12	Nfatc4	-2,0897	A	PPH00223F

Genes Over -Expressed in				
Group 2 (LPS) vs. Control Group				
Position	Gene Symbol	Fold Regulation	Comments	RT2 Catalog
A10	Ccl19	3,3109	A	PPH21138F
A11	Ccl2	44,6791	A	PPH00990H
A12	Ccl3	4,6457	B	PPH00223F
B01	Ccl5	30,9777	A	PPH05666E
B11	Cd40	2,8157	OKAY	PPH00990H
C05	Csf1	3,2848	OKAY	PPH00150F
C07	Csf3	14,6886	B	PPH01018C
C09	Cxcl10	820,2763	A	PPH01020B
C10	Cxcl11	214,1027	A	PPH21138F
D02	Edn1	2,207	A	PPH00073G
D03	Fas	4,1099	OKAY	PPH01094E
E05	Il15	2,0345	OKAY	PPH00150F
E08	Il1a	9,6328	B	PPH01201C
E09	Il1b	14,5755	OKAY	PPH01020B
F03	Il6	3,4757	B	PPH01094E
F09	Nfkb2	2,3693	A	PPH01020B
F10	Nos2	3,0669	A	PPH21138F
G02	Selp	3,544	B	PPH00073G
G03	Ski	14,0966	OKAY	PPH01094E
G09	Stat1	3,4905	OKAY	PPH01020B
H03	Tnf	23,7402	A	PPH01094E
H08	Icam1	23,3441	A	PPH01201C

Genes Under -Expressed in				
Group 2 (LPS) vs. Control Group				
Position	Gene Symbol	Fold Regulation	Comments	RT2 Catalog
B02	Ccr2	-3,2058	OKAY	PPH00073G
C11	Cxcr3	-2,2321	OKAY	PPH00990H
G07	Socs1	-2,1766	OKAY	PPH01018C

Genes Under -Expressed in				
Group 3 (FPS) vs. Group 2 (LPS)				
Position	Gene Symbol	Fold Regulation	Comments	RT2 Catalog
B02	Ccr2	-2,4765	A	PPH00073G

